

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik
für Kinderheilkunde III

Untersuchung des Effektes von RITA auf das Wachstum von Medulloblastomzellen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Aline Gottlieb
aus Dresden

2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1.Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Schulte
2.Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. Klein
3.Gutachter: Herr Prof. Dr. med. S. Rutkowski, Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 2016

Publikation

Eingereicht:

RITA displays anti-tumor activity in medulloblastomas independent of *TP53* status (Gottlieb et al.)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	S.8
1.1	Das Medulloblastom	S.8
1.1.1	Epidemiologie	S.8
1.1.2	Klinisches Erscheinungsbild	S.9
1.1.3	Diagnostik	S.9
1.1.4	Staging und Risikofaktoren	S.10
1.1.5	Prognose und Therapie	S.12
1.1.5.1	Therapie: Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie	S.12
1.1.5.2	Prognose	S.13
1.2	Protein p53	S.13
1.2.1	Funktionen von p53	S.13
1.2.2	Die posttranslationale Regulation	S.15
1.2.3	Die Rolle von p53 bei der Tumorentstehung	S.15
1.2.4	Die p53/ MDM-2 Interaktion	S.16
1.3	RITA (Reactivation and Induction of Tumor apoptosis)	S.18
1.3.1	Die Entdeckung von RITA als p53-modulierender Faktor	S.18
2	ZIELE DER ARBEIT	S.21
3	MATERIALIEN UND METHODEN	S.22
3.1	Materialien	S.22

3.1.1	Verwendete Zelllinien und Plasmide	S.22
3.1.2	Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika	S.23
3.1.3	Verwendete Chemikalien	S.23
3.1.4	Verwendete Verbrauchsmaterialien	S.25
3.1.5	Verwendete Enzyme	S.27
3.1.6	Verwendete Antikörper und Detektionsenzyme	S.27
3.1.7	Verwendete Antikörper für den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten	S.28
3.1.8	Verwendete Lösungen und Puffer	S.28
3.1.9	Verwendete Kits	S.29
3.1.10	Verwendete Oligonukleotide (Primer)	S.29
3.1.11	Verwendete Geräte	S.30
3.2	Zellbiologische Methoden	S.31
3.2.1	Kultivierung von Zellen	S.31
3.2.2	Mikroskopische Aufnahmen von Zellen	S.32
3.2.3	Zellviabilitäts- Assay	S.32
3.2.4	Apoptose- Assay	S.33
3.2.5	Proliferations- Assay	S.34
3.2.6	Zellzyklusanalyse	S.34
3.2.7	Transfektion von HD-MB3 und ONS-76	S.35
3.3	Biochemische Methoden	S.35
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung ihrer Konzentration	S.35
3.3.2	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese	S.36
3.3.3	Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	S.37
3.4	Molekularbiologische Methoden	S.38

3.4.1	Bestimmung und Konzentration von DNA und RNA	S.38
3.4.2	mRNA- Isolierung	S.39
3.4.3	Reverse Transkription von komplementärer DNA aus isolierter mRNA	S.39
3.4.4	Polymerase- Kettenreaktion	S.39
3.4.5	Quantitative PCR	S.41
3.4.6	Agarose- Gelelektrophorese	S.42
3.5	Tierexperimentelle Methoden	S.43
3.5.1	Xenografts	S.43
3.6	Histologische Methoden	S.44
3.6.1	Histologische und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten	
3.7	Statistische Methoden und Bildbearbeitung	S.44
3.7.1	Statistische Analysen	S.44
3.7.2	Bildbearbeitung	S.45
4	ERGEBNISSE	S.46
4.1	Zellbiologische Untersuchungen	S.46
4.1.1	Mikroskopische Aufnahmen von Zellen	S.46
4.1.2	Effekte der RITA- Behandlung auf die Zellviabilität	S.47
4.1.3	Auslösen der Apoptose durch RITA- Behandlung	S.51
4.1.4	Effekte der RITA- Behandlung auf die Proliferation	S.53
4.1.5	Zellzyklusanalyse	S.54
4.1.6	Transfektion von HD-MB3 und ONS-76 mit dominant negativem p53	S.56
4.1.6.1	PCR zur Überprüfung des eingebrachten Vektors	S.56
4.1.6.2	Wirkung von RITA auf Medulloblastomzellen mit dominant negativem p53	S.57
4.1.6.3	Auswirkungen von RITA- Behandlung auf die Apoptoserate von Medulloblastomzellen mit dominant negativem p53	S.58
4.1.6.4	Auswirkungen von RITA- Behandlung auf die Zellproliferation von Medulloblastomzellen mit dominant negativem p53	S.59

4.2 Die Wirkung von RITA auf die Expression bekannter Zielproteine	S.60
4.3 Die Wirkung von RITA auf die Induktion verschiedener Proteine	S.62
4.4 Untersuchungen des Effektes von RITA in Medulloblastom-Xenograft-Mausmodellen	S.63
4.4.1 Beeinflussung des Tumorwachstums durch RITA- Behandlung	S.63
4.4.2 Intensivbehandlung von nu/nu- Mäusen	S.65
4.4.2.1 Immunhistochemische Färbungen	S.65
4.4.2.2 Beeinflussung der mRNA- Expression von MDM-2, p53 und p21 nach RITA-Behandlung	S.69
5 DISKUSSION	S.71
5.1 RITA hemmt die Proliferation in Medulloblastomzellen <i>in vitro</i>	S.72
5.2 RITA wirkt unabhängig vom p53- Status	S.74
5.3 RITA reduziert signifikant das Tumorwachstum von Medulloblastom-Xenografts <i>in vivo</i>	S.76
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	S.79
7 ABSTRACT	S.80
8 LITERATURVERZEICHNIS	S.81
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	S.90
10 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	S.93
10.1 Abbildungsverzeichnis	S.93
10.2 Tabellenverzeichnis	S.95
11 ANHANG	S.96
11.1 Danksagung	S.96
11.2 Lebenslauf	S.97
11.3 Publikationen und Kongressbeiträge	S.98

1 Einleitung

1.1 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Hirntumor im Kindes- und Jugendalter (McNeil, Cote et al. 2002). Es geht überwiegend aus Kleinhirnzellen hervor, zählt zu den primären neuroektodermalen Tumoren (PNET) und damit zu den embryonalen malignen Erkrankungen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumortypen liegt das *p53*-Gen in neuroektodermalen-embryonalen Tumoren nur selten mutiert vor (Saylors, Sidransky et al. 1991; Benard, Douc-Rasy et al. 2003). In den letzten Jahren konnte in Tumoren mit Wildtyp *p53* (Wt *p53*) festgestellt werden, dass eine *p53*-Inaktivierung auf vielen verschiedenen Wegen erreicht werden kann, hierzu zählen u.a. die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung (Benard, Douc-Rasy et al. 2003; Papazoglu and Mills 2007; Fridman and Tainsky 2008). Dies trifft auch auf das Medulloblastom zu, das in weniger als 10% eine *p53*-Mutation aufweist (Biegel 1999; Ellison 2002).

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Häufigkeit von ca. 25% stellen die PNET die zweitgrößte Entität der Hirntumoren bei Kindern und Jugendlichen dar. In 20-25% der Fälle werden sie auch bei jüngeren Erwachsenen beobachtet (2012). Etwa drei Viertel dieser Tumore stammen vom Kleinhirn ab und werden als Medulloblastome bezeichnet. Sie werden in der Regel zwischen dem 5. und 7. Lebensjahr diagnostiziert, wobei eher Jungen als Mädchen (Verhältnis 1,5:1) betroffen sind. Das Medulloblastom wächst lokal infiltrierend und kann in den gesamten Liquorraum metastasieren (Hämatologie 2012). Bei ca. einem Drittel der Erstdiagnosen werden Metastasen festgestellt. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate beträgt beim Vorliegen von Metastasen 40–70% trotz verschiedenster Therapieoptionen (Bestrahlung, Operation, Chemotherapie)(Massimino, Cefalo et al. 2012), weswegen man verstärkt nach anderen Möglichkeiten sucht, um diese Tumoren zu behandeln.

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild ist sehr von der genauen Lage des Tumors sowie vom Alter des Kindes abhängig. So unterscheidet man zwischen lokal- und unspezifischen Fernsymptomen. Bei Medulloblastomen des vierten Ventrikels und des *Vermis cerebelli* treten früh Hirndrucksymptome auf, die zu den unspezifischen Fernsymptomen gehören. Dazu zählen die Stauungspapille als definitiver Beweis für erhöhten Hirndruck sowie morgendliche Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen mit drückendem Charakter. Der erhöhte Hirndruck entsteht entweder durch den Tumor selbst, der auf anderes Hirngewebe drückt und somit ein Ödem in dieser Umgebung verursacht, oder aber durch Liquorabflussstörungen. Ataktische Störungen, die man zu den Lokalsymptomen zählt, werden hingegen, vor allem bei jungen Kindern, erst relativ spät erkannt. Handelt es sich hierbei um eine Gang- und Standataxie ist sehr wahrscheinlich der Vermis betroffen, bei einer Extremitätenataxie die gleichseitige Kleinhirnhemisphäre. Bei Metastasierungen können z.B. auch spinale neurologische Symptome auftreten (Gadner, Gaedicke et al. 2006).

1.1.3 Diagnostik

Zunächst erfolgt bei Verdacht auf einen Hirntumor eine ausführliche neurologische Untersuchung sowie der Ausschluss bzw. die Feststellung einer Stauungspapille durch eine Augenhintergrundspiegelung. Erfolgt hierbei ein positiver Befund sollte als nächstes ein Schädel- MRT oder ein CT (nativ und mit Kontrastmittelgabe) durchgeführt werden. Die Befundsicherung eines Hirntumors erfolgt meist mithilfe einer Biopsie.

Auch die Lumbal- oder ggf. Ventrikelpunktion, die dem Nachweis von Tumorzellen im Liquor dienen, zählen zu den Maßnahmen im Rahmen der initialen Diagnostik und des Stagings. Ebenso sollte präoperativ ein Spinal- MRT zum Nachweis einer primären Metastasierung durchgeführt werden. Im Falle von spinalen Metastasen besteht die Möglichkeit, den Tumor zunächst mit einer Chemotherapie zu behandeln und ihn erst dann zu operieren (Gadner, Gaedicke et al. 2006).

1.1.4 Staging und Risikofaktoren

Es existiert eine seit 1977 bestehende modifizierte Klassifikation nach Chang, die eine Einteilung nach Tumorgröße sowie nach Metastasierungsgrad vornimmt.

Tab. 1: Stadieneinteilung für Medulloblastome nach Chang (Chang 1969)

Stadium	Definition
T1	Tumordurchmesser < 3cm, begrenzt auf Vermis, <i>Tentorium cerebelli</i> oder Kleinhirnhemisphäre
T2	Tumordurchmesser > 3cm, Eindringen in <i>Crus cerebellaris</i> oder teilweise in den IV. Ventrikel
T3a	Infiltration von mindestens zwei umliegenden Strukturen oder vollständige Ausfüllung des IV. Ventrikel mit Ausdehnung zum Äquadukt, den <i>Foramina Luschkae</i> und <i>Magendii</i> aus, Hydrozephalus internus
T3b	Tumor füllt den IV. Ventrikel vollständig aus und infiltriert den Hirnstamm bzw. den Boden des IV. Ventrikels
T4	Ausdehnung jenseits des Äqudukts bis ins Mesenzephalon oder in den III. Ventrikel oder Ausdehnung bis zum oberen Halsmark
M0	Keine Metastasen
M1	Mikroskopischer Tumorzellnachweis im Liquor
M2	Makroskopische Metastasen in cerebellaren und/oder cerebralen Subarachnoidalraum und/oder in den supratentoriellen Ventrikeln
M3	Makroskopische Metastasen im spinalen Subarachnoidalraum
M4	Metastasen außerhalb des ZNS

Die Tumoreinteilung ist teilweise im Hinblick auf die prognostische Relevanz umstritten. Einigkeit besteht allerdings bei der Tatsache, dass der Metastasierungsgrad mit einer inversen Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. Ein M1- Nachweis bei Diagnosestellung tritt in ca. 25% der Fälle auf. Solide intrakranielle (M2) oder spinale Metastasen (M3) liegen initial bei 30% der Kinder vor, M4 Stadien sind sehr selten.

Zurzeit ist man damit beschäftigt, weitere Risikofaktoren zu bestimmen, um eine Einteilung in Risikogruppen vornehmen zu können und eine daran angepasste

Therapie zu bestimmen. Taylor *et al.* (Taylor, Northcott et al. 2012) untersuchte hierzu Hinweise auf molekularbiologisch determinierte Risikofaktoren. Aktuell einigt man sich auf vier Subgruppen bzw. molekulare Gruppen, in die das Medulloblastom eingeteilt werden kann: SHH, WNT, Gruppe 3 und Gruppe 4 (Kool, Korshunov et al. 2012; Taylor, Northcott et al. 2012).

Tab. 2 Subgruppen der Medulloblastome

Konsens	WNT	SHH	Gruppe 3	Gruppe 4
Demographische Daten				
Altersgruppe (S=Säugling, K=Kind, E=Erwachsener)	K > E	S > K < E	S < K	S < K > E
Geschlecht	w= m	w= m	m > w	m > w
Klinik				
Histologie	klassisch, selten großzellig und anaplastisch (LCA)	desmoplastisch/nodular, klassisch, großzellig und anaplastisch (LCA)	klassisch, großzellig und anaplastisch (LCA)	klassisch, großzellig und anaplastisch (LCA)
Metastasen	selten	ungewöhnlich	Sehr häufig	häufig
Prognose	Sehr gut	Säuglinge gut, andere intermediär	schlecht	intermediär
Genetik	CTNNB1-Mutation	PTCH1/SMO/SUFU Mutation, GLI2 Amplifikation, MYCN Amplifikation	MYC Amplifikation	CDK6-Amplifikation, MYNC-Amplifikation
Genexpression	MYC+	MYCN+	MYC+++	Minimales MYC/MYCN

1.1.5 Prognose und Therapie

1.1.5.1 Therapien des Medulloblastom: Operation, Bestrahlung, Chemotherapie

Eine besonders große Rolle in der Therapie des Medulloblastom spielt vor allem die primäre Resektion des Tumors, da sich die Patienten durch die Raumforderung bzw. die Liquorzirkulationsstörung in Lebensgefahr befinden. Heutzutage ermöglichen mikrochirurgische Operationstechniken eine vollständige Resektion des Tumorgewebes in über 50% der Fälle. Die Schwierigkeit bei dieser Art von Operationen liegt darin, intaktes Hirngewebe und Hirnnerven nicht zu verletzen. Da Medulloblastome zur Metastasierung vor allem im Liquorbereich neigen, ist eine Bestrahlung des gesamten Liquorraumes unter Einschluss des Gehirnes und Rückenmarkes notwendig, um eine Heilung zu erzielen. Als Standard gilt bisher die kraniospinale Bestrahlung mit 36 Gy bei einer Einzeldosis von 1,6-1,8 Gy/Tag über insgesamt dreieinhalb Wochen. Aktuelle Studien zeigen, dass bei hyperfraktionierter Strahlenbehandlung der kraniospinalen Achse die Nebenwirkungen für das ZNS sehr hoch und das Risiko eines Zweittumors ebenso erhöht waren (Allen, Archangelskaya et al. 1996; Prados, Edwards et al. 1999). Bei einer Gesamtdosis von 36 Gy/Woche wurde eine Tumorkontrolle lokal und innerhalb des Liquorraums von über 90% erzielt. Diese Quote ließ sich durch Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie sogar noch steigern (Kuhl 2000).

Da das Medulloblastom mit einem Ansprechen von 60-70% der am meisten chemotherapiesensible Hirntumor ist, spielen Chemotherapeutika eine wichtige Rolle. Aufgrund verschiedener Studien hat sich eine 3-fach Kombination bestehend aus Vincristin, Lomustin und Cisplatin etabliert (Kortmann, Kuhl et al. 2000). Anhand dieser Behandlung lassen sich v.a. Metastasen besser kontrollieren bzw. nimmt deren Inzidenz stark ab (Tarbell, Loeffler et al. 1991). Besonders effektiv scheint im Rahmen der Chemotherapie die intraventrikuläre Gabe von Methotrexat zu sein (Kuhl 2000). Ein weiterer Vorteil ist, dass die Strahlendosis unter Chemotherapie reduziert werden kann.

Die Therapieerfolge bei Patienten, die bereits Metastasen aufweisen, sind jedoch nach wie vor enttäuschend. Am „effektivsten“ ist hierbei die intensivierte, hyperfraktionierte Strahlentherapie. Zudem hoffe man diesen Patienten durch Neuentwicklung von Chemotherapeutika zukünftig besser helfen zu können.

Als eine weitere Methode zur Behandlung des Medulloblastom ist an dieser Stelle außerdem noch die stereotaktische Radiochirurgie zu nennen. Diese funktioniert nach dem Einzeldosis-Konvergenz-Prinzip, wobei 1-2mm außerhalb des Zielvolumens mit keiner Schädigung mehr zu rechnen ist (Kuhl 1998; Kortmann, Kuhl et al. 2000; Kuhl 2000).

1.1.5.2 Prognose

Das Alter des Kindes hat einen sehr hohen Einfluss sowohl auf die Prognose und die Wahl der Therapie als auch auf die therapiebedingten Spätfolgen. Besonders bei Kindern in den ersten drei Lebensjahren wächst das Medulloblastom besonders aggressiv. Ebenso haben die Existenz bzw. das Fehlen von Resttumoren Einfluss auf die Prognose. Retrospektive Studien zeigten, dass Patienten mit Resttumor innerhalb der nächsten fünf Jahre eine doppelt so hohe Wahrscheinlichkeit haben, an der Tumorerkrankung zu sterben, als Patienten ohne Resttumor (Gadner, Gaedicke et al. 2006). Daher ist es umso wichtiger, Medikamente zu entwickeln, die in der Lage sind, das Wachstum von Medulloblastomen potent zu inhibieren. Hier stehen besonders die zielgerichteten Therapien im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Eine therapeutische Option ist die Reaktivierung des p53-Signalwegs, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.2 Protein p53

1.2.1 Funktion

Das Protein p53 spielt eine Schlüsselrolle in den verschiedensten intrazellulären Mechanismen. Eine der Hauptaufgaben von p53 ist es, der Zelle zu helfen, angemessen auf verschiedene Arten von zellulärem Stress, z.B. Hypoxie, DNA-

Schäden, metabolischem Stress und wechselnden Proliferationssignalen zu reagieren (Abb.1) (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010).

In seiner aktiven Form liegt p53 als Tetramer vor und fungiert dann als Transkriptionsfaktor, der die Expression von Gene reguliert, die am Zellzyklus (über p21), an der Apoptose (über BAX), der DNA-Reparatur, der Angiogenese und der Zellseneszenz beteiligt sind. Durch die Induktion anti- proliferativer Prozesse, von Zellzyklusarrest und Apoptose kann p53 sehr effektiv das Überleben prä-neoplastischer Zellen unterbinden bzw. einschränken (Kunkele, De Preter et al. 2012).

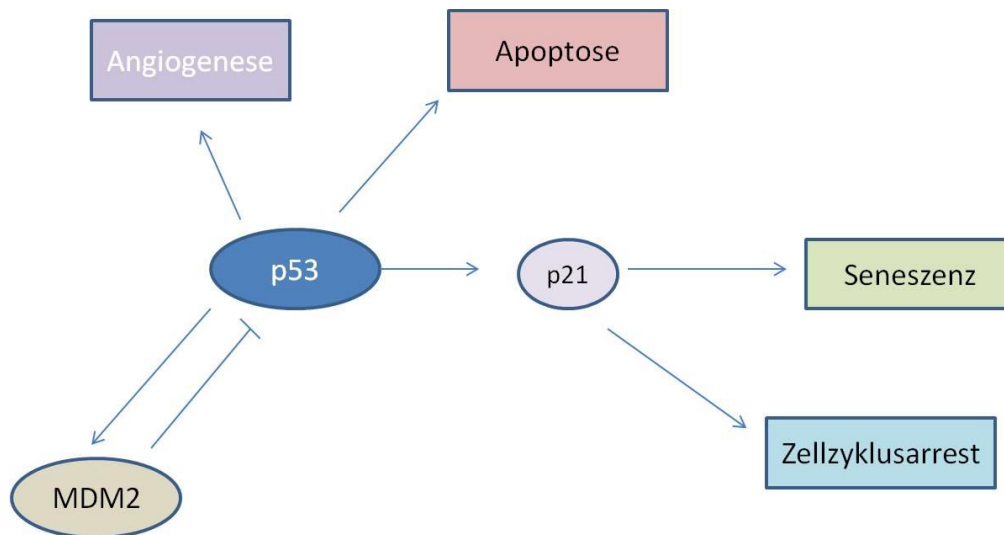


Abb.1 Zelluläre Mechanismen, die durch p53 gesteuert werden. Modifiziert nach Di Cintio (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010)

Des Weiteren kann p53 einen Zellzyklusarrest sowohl in der G1- als auch in der G2/M- Phase auslösen und reguliert die Angiogenese (Hermeking, Lengauer et al. 1997; Harris and Levine 2005; Lee and Lozano 2006). In vielen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass p53 die Tumor- Vaskularisierung einschränkt. So sind Tumoren, die ein mutiertes *p53* haben, deutlich stärker vaskularisiert, als solche mit Wt *p53*. Dabei inhibiert p53 die Angiogenese über drei verschiedene Mechanismen: 1) Inhibition von Hypoxie-registrierenden Systemen, 2) Hochregulation von antiangiogenen Faktoren, wie z.B. dem Thrombospondin-1

(TSP-1) und 3) Herabregulation von angiogenen Faktoren, wie z.B. VEGF (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010).

Schließlich deuten mittlerweile viele Ergebnisse u.a. in Maus- Modellen darauf hin, dass p53 auch das Altern der Zellen beeinflusst (Artandi and Attardi 2005; Guo and Mills 2007). P53 reguliert Gene in Zellen, die nur ein begrenztes Potential zur Proliferation haben und als Modulatoren der Zellseneszenz fungieren (Fridman and Tainsky 2008).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch einen Funktionsverlust von *p53* zumindest teilweise zelluläre Immortalität erreicht werden kann, ein wichtiger Schritt in der Transformation eines Tumors (Papazoglu and Mills 2007).

1.2.2 Post-translationale Regulation von p53

Die Funktion von p53 wird durch verschiedene Mechanismen post- translational reguliert. Dazu gehören Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung (Chen, Marechal et al. 1993; Picksley, Vojtesek et al. 1994; Shangary and Wang 2008). In einer Zelle, die keinen Stress erfährt, ist p53 inaktiv und befindet sich durch Ubiquitinierung und nachfolgendem Abbau durch das Proteasom nur in niedrigen Konzentrationen in der Zelle. Sobald es zum Auftreten von zellulärem Stress kommt, wird die Ubiquitinierung reduziert und p53 wird allmählich stabilisiert, so dass es in den Zellkern einwandern kann, um hemmend oder fördernd auf die Transkription der Zielgene einwirken zu können (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010).

1.2.3 Rolle von p53 bei der Tumorentstehung

Mehr als 50% der menschlichen Tumoren weisen eine Mutation im *p53* auf und über 90% dieser Mutationen kommen in soliden Tumoren vor (Nagy, Sweet et al. 2004). Es gibt drei verschiedene p53- Veränderungen, die der Entstehung von Tumoren zugrunde liegen können: 1) Keimbahnmutationen, 2) Polymorphismen und 3) somatische Mutationen.

Mutationen im *p53* führen zu einer verlängerten Halbwertszeit und einer nicht adäquaten Funktion entsprechender Varianten im Vergleich zum Wt *p53* (Soussi and Lozano 2005; Suad, Rozenberg et al. 2009). Diese Mutationen können, aufgrund unterschiedlicher Affinität zu bestimmten Proteinen, nur eine oder wenige Funktionen betreffen. Dies gilt z.B. für die mutierten Proteine p53-R175P und p53-R181C, die zwar p21 aktivieren können, aber nicht BAX, und somit nicht in der Lage sind, Apoptose auszulösen (Ludwig, Bates et al. 1996; Smith, Crossland et al. 1999). Allerdings gibt es auch Mutationen in *p53*, die zu einer irregulären c-MYC oder VEGF-Aktivierung führen (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010). Die dadurch neu- gewonnenen Funktionen sind u.a. ursächlich für die Resistenz einiger Tumoren gegenüber Chemotherapeutika (Cadwell and Zambetti 2001).

Wie oben bereits erwähnt, findet sich jedoch in der Mehrzahl der neuroektodermalen-embryonalen Tumoren keine Mutationen im *p53* (Saylors, Sidransky et al. 1991; Benard, Douc-Rasy et al. 2003). Im Falle des Medulloblastoms weisen weniger als 10% der Tumore eine *p53* Mutation auf (Biegel 1999; Ellison 2002), sodass die Funktion des *p53* anderweitig eingeschränkt sein muss. Eine mögliche Option ist die Veränderung/Überexpression der *p53*- regulierenden Gene. In einer vorangegangenen Arbeit konnte für das Medulloblastom gezeigt werden, dass eine Überexpression von MDM-2 ursächlich für den Funktionsverlust des Wt *p53* war (Kunkele, De Preter et al. 2012). Bereits 1995 gelang es Rosenfeld et al. erstmals, durch einen Gen- Transfer von Wt *p53* die Funktion von *p53* in einem präklinischen Modell des Medulloblastoms wiederherzustellen (Rosenfeld, Meneses et al. 1995).

1.2.4 *p53*/MDM-2 Interaktion

Bereits vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass Wt *p53* häufig durch die E3 Ubiquitin- Ligase MDM-2 gehemmt wird, indem es an die N-terminale Transkriptions-Aktivierungs-Domäne von *p53* bindet und damit für dessen proteasomalen Abbau sorgt (Haupt, Maya et al. 1997; Toledo and Wahl 2006; Wu,

Pomeroy et al. 2011). In Abwesenheit von Stress sorgt eine geringe Konzentration von MDM-2 für eine Monoubiquitinierung von p53 (p53-Ub). Dies führt zur Aufrechterhaltung niedriger p53-Ub Spiegel im Cytoplasma (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010). Wenn es zu einem DNA- Schaden kommt und p53 aktiviert wird, induziert es die Transkription von MDM-2, wodurch es zu einer Polyubiquitinierung und zum Abbau von p53 im Zellkern kommt. Eine Überexpression von MDM-2 sorgt daher dafür, dass p53 weder seiner Transkriptions- noch seiner Apoptose- und Zellzyklusarrest- Funktion nachkommen kann. Amplifikationen oder Überexpression von MDM-2, die zu einem erhöhten Abbau von p53 führen, werden in Tumoren mit Wt p53 häufig gefunden (Giordana, Duo et al. 2002). MDM-2 sorgt zusätzlich gleichermaßen für seinen eigenen Abbau wenn es zu Stresssituationen für die Zelle kommt. Damit komplettiert es den sehr komplexen Regelkreis (Toledo and Wahl 2006).

Obwohl eine Amplifikation des MDM-2 in 7% aller bösartigen Tumore vorkommt (Toledo and Wahl 2006), konnte dies bei Medulloblastomen bisher nicht festgestellt werden (Adesina, Nalbantoglu et al. 1994; Batra, McLendon et al. 1995). Jedoch wurde in einigen Medulloblastomen von Erwachsenen eine Überexpression des MDM-2-Proteins festgestellt (Giordana, Duo et al. 2002). Weiter wurde gezeigt, dass durch einen Verlust von MDM-2 in einer *Ptch1*^(+/-) Maus, einem Modell für sonic hedgehog- induzierte Medulloblastome, das Tumorstwachstum im Kleinhirn unterbunden werden konnte (Malek, Matta et al. 2011).

In einer vorherigen Studie konnten Künkele et al. für die hier verwendeten Medulloblastomzelllinien (DAOY, D-341, HD-MB3, ONS-76, UW-228) zeigen, dass 1) MDM-2 signifikant höher in Medulloblastomzellen als in normalem Kleinhirngewebe exprimiert ist und 2) keine Amplifikation sondern eine Überexpression des MDM-2- Gens vorliegt (Künkele, De Preter et al. 2012). Substanzen, welche die p53-MDM-2 Interaktion unterbrechen, sei es durch Hemmung der MDM-2- Überfunktion oder durch Blockade der MDM-2-p53 Bindungsstelle sind daher attraktive Kandidaten für gerichtete Therapien des Medulloblastoms.

1.3 RITA (Reactivation of p53 and Induction of tumor apoptosis)

1.3.1 Entdeckung von RITA als p53-modulierenden Faktor

In den letzten Jahren gelang es, durch die Wiederherstellung der adäquaten p53-Funktion (sofern keine p53 Mutation vorlag), mit niedermolekularen Molekülen bereits etablierte Tumore, u.a. Lymphome, Weichteil-Sarkome und Leberzellkarzinome, effektiv *in vitro* und *in vivo* zu therapieren (Martins, Brown-Swigart et al. 2006; Ventura, Kirsch et al. 2007; Xue, Zender et al. 2007).

2004 wurde im Rahmen eines Screenings von Issaeva *et al.* die als RITA (*Restoration of p53 function and Induction of Tumor Apoptosis*) bezeichnete Substanz entdeckt (Issaeva, Bozko et al. 2004), welche durch die Blockade des N-Terminus von p53 die Interaktion von MDM-2 mit p53 unterbindet (Abb.2+3). Ein damit verbundener anti-tumoraler Effekt wurde in z.B. in Kolonkarzinom- und anderen Tumorzellen beobachtet, die Wt p53 exprimieren aber nicht in Zellen, mit funktionslosem oder mutiertem p53 (Issaeva, Bozko et al. 2004; Grinkevich, Nikulenkov et al. 2009; Saha, Jiang et al. 2010). Die Blockierung der Ziel-Gene erfolgte dosisabhängig, aber hatte keinen Einfluss auf die Bindungen im Kern. Behandlung mit RITA führte zu einer Reduktion von ubiquitiniertem p53 und zur Wiederherstellung der pro-apoptotischen Funktionen von p53.

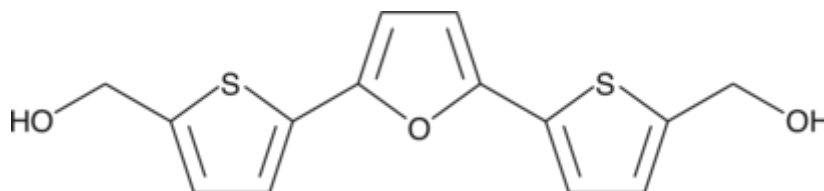


Abb. 2 Chemische Struktur von RITA

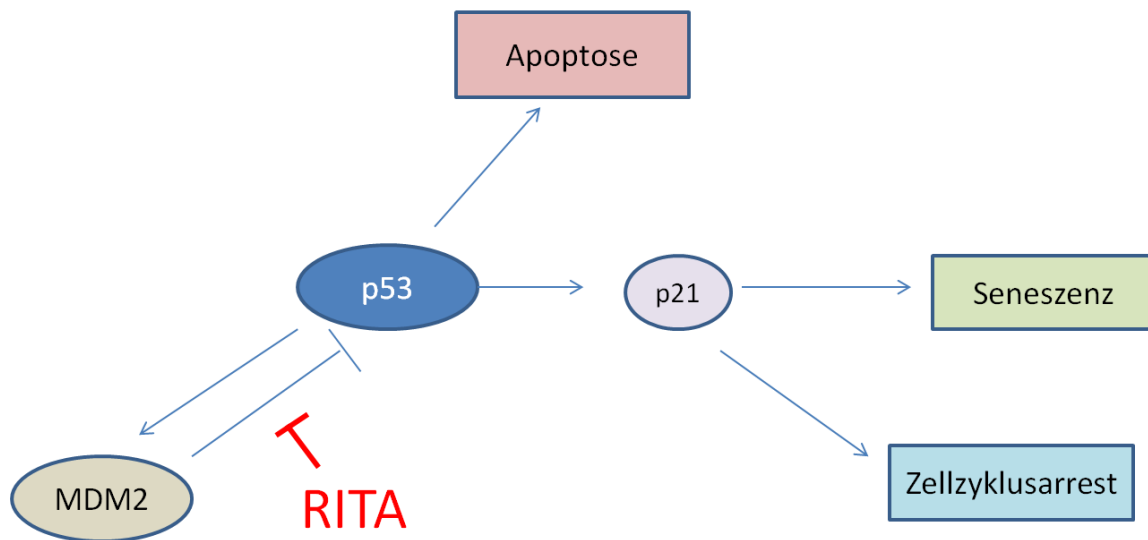


Abb. 3 Schaubild der Wirkung von RITA (verändert nach Di Cintio(Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010))

In den letzten Jahren ergaben Untersuchungen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit der Wirkung von RITA vom p53- Status. Einerseits gibt es Studien, die besagen, dass die Funktion von RITA p53- abhängig ist (Enge, Bao et al. 2009). Dabei wird angenommen, dass RITA im ersten Schritt schnell an p53 bindet und dann in einem langsameren zweiten Schritt, indem p53 eine Konformationsänderung erfährt, die Bindung von MDM-2 blockiert (Issaeva, Bozko et al. 2004). Es ist möglich, dass RITA aufgrund der Bindung am Amino-Terminus von p53 Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der MDM-2-Bindungsstelle beeinflusst. Dies würde wiederum die Formation der für die MDM-2- Bindung benötigten α -Helix blockieren. Andererseits haben theoretische Berechnungen gezeigt, dass RITA auch an die p53-Bindungsstelle von MDM-2 binden kann, was bedeuten würde, dass RITA ein multi-target Molekül ist, das unabhängig vom p53- Status agieren kann (Selivanova 2004; Espinoza-Fonseca 2005).

Weiterhin konnte in anderen Studien auch ein Zusammenhang zwischen der RITA-Behandlung und der Expression von ektoischem c-Myc, die durch RITA stark reduziert wurde und damit auf eine Regulation auf posttranslationaler Ebene

hinweist, beobachtet werden (Grinkevich, Nikulenkov et al. 2009). Zusätzlich scheint RITA einen Einfluss auf die tumorinduzierte Angiogenese zu haben, indem es die Induktion von HIF-1 α und VEGF hemmt (Yang, Ahmed et al. 2009).

Da es bisher noch keine Phase I- Studien zu RITA gibt, muss präklinisch zunächst untersucht werden, ob die Aktivierung von p53 durch RITA gesunde Zellen angreifen kann oder nicht.

In einem murinen Tumor-Modell mit reversibler p53-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass die Auslösung von Apoptose durch p53 prinzipiell Tumorzell-spezifisch war (Martins, Brown-Swigart et al. 2006). Der exakte Mechanismus ist bisher jedoch nach wie vor nicht komplettverstanden worden (Selivanova 2004), die Wirkung von RITA auf Medulloblastomzellen ist bisher nicht bekannt.

2 Ziele der Arbeit

Mit einem Anteil von 20% an allen Kinderhirntumoren ist das Medulloblastom eine Tumorentität, die mit seiner durchschnittlichen Überlebensrate trotz verschiedenster Therapieoptionen (Bestrahlung, Operation, Chemotherapie) bei nur 40–70% liegt. Daher sucht man verstärkt nach anderen Möglichkeiten, um diese Tumoren zu behandeln.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Tumoren weisen Medulloblastome häufig keine *p53*-Mutation auf, sondern inaktivieren *p53* durch vermehrte Bildung von MDM-2. Der Einsatz von Inhibitoren, welche die MDM-2-*p53*- Interaktion unterbinden und die reguläre *p53*- Funktion wieder herstellen können, stellt daher eine vielversprechende Therapieoption für Medulloblastome dar. Zu dieser Substanzklasse zählt RITA (*Restoration of p53 and Induction of Tumor Apoptosis*), dessen Wirksamkeit bereits in mehreren Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte. In dieser Studie soll untersucht werden, inwiefern RITA das Wachstum von Medulloblastomzelllinien hemmt und ob diese Wirkung vom *p53*- Status (mutiert bzw. Wt *p53*) abhängig ist. Dafür wurden fünf Medulloblastomzelllinien *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen an RITA behandelt, der Effekt mittels Viabilitäts- und Apoptose-Assays untersucht und der Einfluss auf den *p53*- Signalweg auf Protein- und mRNA- Ebene analysiert. Zuletzt wurde die anti- tumorale Wirkung von RITA *in vivo* an einem subkutanen Xenograft Mausmodell untersucht. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- 1.) Besitzt RITA eine anti-proliferative Aktivität gegenüber Medulloblastomzellen *in vitro*?
- 2.) Ist eine anti-proliferative Wirkung von RITA gegenüber Medulloblastomzelllinien abhängig vom *p53*- Mutationsstatus?
- 3.) Beeinflusst RITA die in den *p53*- Signalweg involvierten Proteine *p21* und MDM-2?
- 4.) Hat RITA auch in *in vivo* eine antitumorale Aktivität gegen Medulloblastom?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Zelllinien und Plasmide

Tab. 3 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	p53- Status	Bereit gestellt von
D-341	Wt <i>p53</i>	ATCC (Manassas, USA)
HD-MB3	Wt <i>p53</i> mit einem nichtfunktionellen SNP	Dr. med. Hedwig Deubzer (Berlin, Deutschland)
ONS-76	Wt <i>p53</i> mit einem non-functional SNP	ATCC (Manassas, USA)
DAOY	<i>p53</i> mutiert	ATCC (Manassas, USA)
UW-228	<i>p53</i> mutiert	ATCC (Manassas, USA)
rekombinante Zelllinien		
HD-MB3 dn <i>p53</i>	Dominant neg. <i>p53</i>	Herstellung im Labor (generiert in Zusammenarbeit mit Natalie Solomentsew)
ONS-76 dn <i>p53</i>	Dominant neg. <i>p53</i>	(Annette Künkele, (Künkele, De Preter et al. 2012)Berlin)

Tab. 4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft
SCV puro <i>p53</i> dd (dnp53)	Prof. Eilers (Würzburg, Deutschland)
pMSCV puromycin	Addgene, #K1062-1, Cambridge, MA, USA

3.1.2 Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika

Tab. 5 Verwendete Zellkulturlösungen und allgemeine Zusätze

Zellkulturlösungen	Firma
Amphotericin B	PAA (Pasching, Deutschland)
Fetales Kälberserum	PAA (Pasching, Deutschland)
L- Glutamin	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
Opti-MEM – Medium	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
RPMI Medium 1640	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen (Hilden, Deutschland)

3.1.3 Verwendete Chemikalien

Tab. 6 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Complete Protease Inhibitoren	Roche (Mannheim, Deutschland)
Detektionsreagenz ECL Plus™	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DNA-Standard	LifeTechnologies (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (Hepes)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg, Deutschland)
Matrigel™	BD (Heidelberg, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge NaOH 1M	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
NP- 40	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitoren	Roche (Mannheim, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PonceauS	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Propidiumiodid	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Proteingrößenmarker dual color	Bio- Rad (München, Deutschland)
Proteingrößenmarker unstained	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Proteingrößenmarker unstained	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Qiazol	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rotiphorese Gel 30	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®- Quant (Bradfordreagenz)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris HCL	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton-X 100	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tab. 7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Combitips (0,5; 2,5; 5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Cryoröhrchen	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Einwegpipette (2; 5; 10, 25 ml)	Greiner bio- one (Frickenhäusen, Deutschland)

Hybond-™C Extra Nitrozellulose-Membran	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Injekt-F 1 ml Einmalspritzen	Braun (Melsungen, Deutschland)
Kanülen 0,4mm Durchmesser	Braun (Melsungen, Deutschland)
Parafilm	Pechinery (USA)
Pasteurpipetten	Brand (Werheim, Deutschland)
PCR Tubes	Axygen (USA)
Pinzetten	Finescience Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg, Deutschland)
PMMA- Einmalküvetten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PP- Röhrchen	Greiner bio- one (Frickenhausen, Deutschland)
Ohrlochzange	Finescience Tools (Heidelberg, Deutschland)
Safe Lock Tubes (1,5; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Scheren	Finescience Tools (Heidelberg, Deutschland)
Skalpelle	Servopax (Wesel, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellkulturschalen (96-Loch; 6-Loch)	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellschaber 28cm	Greiner bio- one (Frickenhausen, Deutschland)
Zellulose Blot Papier 3 mm dick	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

3.1.5 Verwendete Enzyme

Tab. 8 Verwendete Enzyme und Nukleotide

Enzym	Firma
GoTaq Hot Start Polymerase (+5x Puffer)	Promega (Mannheim, Deutschland)
Nukleotid- Mix (dNTP)	Bio- Budget (Krefeld, Deutschland)
Proteinase K	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
RNAse A	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Taq- DNA- Polymerase	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

3.1.6 Verwendete Antikörper und Detektionsenzyme für Western Blot

Tab. 9 Verwendete Antikörper und Detektionsenzyme für Western Blot

Primär-antikörper	Herkunfts-organismus	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
anti- p21 (187)	Kaninchen	abcam (Cambridge)	sc-817	1:500
anti- p53	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	sc-71817	1:500
anti- MDM-2	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	Sc-5304, sc-813	1:1000
anti- β - Actin	Maus	Sigma Aldrich (Steinheim)	A5441	1:2000
Sekundärantikörper				
anti- Mouse IgG HRP (NA9340V)	Schaf	GE Healthcare (Freiburg)	NA9310V	1:2000
anti- Rabbit IgG HRP (NA9340V)	Esel	GE Healthcare (Freiburg)	NA9340V	1:2000

3.1.7 Antikörper für den immunohistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten

Tab. 10 Verwendete Antikörper für immunohistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeabschnitten

Antigen	Bestellnummer	Verdünnung
anti-Caspase 3	9661 (Cell Signaling)	1:200
anti- p53	ab4060 (abcam)	1:500
anti-MDM-2	ab38618 (abcam)	1:50
anti-ki-67	ab16667 (abcam)	1:500

3.1.8 Verwendete Lösungen und Puffer

Anode 1- Puffer: 300 M Tris, 20% Methanol

Anode 2- Puffer: 25 mM Tris, 20% Methanol

Blotto: 5% Milchpulver, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 80 mM NaCl, 2mM CaCl₂, 0,2 % NP-40

Cathode Puffer: 25 mM Tris, 40 mM Glycin, 10% Methanol, 10% SDS

ECL- Lösung I: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarsäure, 100 mM Tris-HCl pH 8,5

ECL - Lösung II: 100 mM Tris-HCl pH 8,5

GTS Laufpuffer 10x: Glycin 144,2 g, Tris 30,3 g, SDS 10 g,

Ladepuffer: Tris HCl 0,666 g, Tris Base 0,682 g, LDS 0,8 g, EDTA 0,006 g, Coomassie 1% 0,75 ml, Phenolrot 1% 0,25 ml, Glycerin 4g,

LAEMMLI-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol

MTT Solubilisierungslösung (für adhärenzte Zellen): DMSO 100 ml, SDS 10%, 0,6 ml Essigsäure

MTT Solubilisierungslösung (für Suspensionszellen): DMSO 100 ml, 10% SDS, 5% Essigsäure

Ponceau S-Lösung: 0,1% Ponceau S, 5 % Essigsäure

1 M H₂SO₄

PBS-T_{0,02}: 0,02% Tween 20 in PBS

Propidium- Iodide stain (1 mg/ml)

RIPA Puffer: 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Triton-X-100, 0,1% SDS

Sammelgel (4%): 2,48 ml H₂O, 0,52 ml Acrylamid (30%-ig), 4xTrisHCl/SDS pH 6,8

Trenngel (10%): 4,2 ml H₂O, 3,3 ml Acrylamid (30%-ig), 4xTrisHCl/SDS pH 8,8

3.1.9 Verwendete Kits

Tab. 11 Verwendete Kits

Kit	Firma
Cell Proliferation ELISA Kit, BrdU	1647229001 - Roche (Mannheim, Deutschland)
Cell Death Detection ELISAPlus KIT	11774425001 - Roche (Mannheim, Deutschland)
ECL Western Blot Detektion Kit	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
EnVision™ Kits	Dako (Hamburg, Deutschland)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miScript Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

3.1.10 Verwendete Oligonukleotide (Primer) für qPCR

Tab. 12 Verwendete Oligonukleotide (Primer) für qPCR

Primer	Sequenz	Firma	qPCR Kit
CDKN1A/ P21	Sequenz von Herstellen nicht freigegeben	QT00062090 (Qiagen)	Fast SYBR® Green Master Mix
MDM-2	Sequenz von Herstellen nicht freigegeben	QT00056378 (Qiagen)	Fast SYBR® Green Master Mix
GAPDH	<i>fwd:</i> catcaagaaggtggtgaagc <i>rev:</i> gagcttgacaaagtggctgt	Eurofins	Fast SYBR® Green Master Mix

3.1.11 Verwendete Geräte

Tab. 13 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Allegra X-22R Zentrifuge	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Automatischer Zellzähler	BioRad (München, Deutschland)
Autostainer	Dako (Hamburg, Deutschland)
Axiovert 40CFL Mikroskop	Carl Zeiss <i>Microscopy</i> GmbH (Jena, Deutschland)
Biodoc Analyzer	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
CO ₂ - Inkubator	Biomedis (Gießen, Deutschland)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Elektronische Schieblehre	Baumarkt Obi (Essen, Deutschland)
Enduro 250V Power Supply	Labnet (Ried im Innkreis, Deutschland)
Epoch Spektralphotometer-System	BioTech (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Flow Cytometers FC 500	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Fusion FX7	peqlab (Erlangen, Deutschland)
Gene Pulser Xcell	BioRad (München, Deutschland)
GFL 3005 Schüttler	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Laborwaage EW 420-3NM	Kern & Sohn (Balinge-Frommen, Deutschland)
Mikro22R Kühlzentrifuge	Hettich (Kirchlengern, Deutschland)
Mini- PROTEAN 2 Westernblotzubehör	BioRad (München, Deutschland)

Modulus Microplate Reader	Turner Biosystems/ Promega (Mannheim, Deutschland)
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqlab (Erlangen, Deutschland)
Multipipette Stream	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
real-time Thermozykler	Step One Plus (USA)
RM5- Assistant Rollschüttler	Braun (Melsungen, Deutschland)
Rotixa 50RS Zentrifuge	Hettich (Mülheim a.d. Ruhr, Deutschland)
Rührer	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Schüttelwasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)
StepOne Plus Real- Time- PCR	Applied Biosystems (USA)
Sterilbank HERA- Safe HS12	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Target Retrieval Solution	Dako (Hamburg, Deutschland)
Thermal Cycler C1000	Biorad (München, Deutschland)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415D + Rotor	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Trans-Blot® Turbo™	Biorad (München, Deutschland)
Vortex	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Z1 Coulter Partikel Counter	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zellkulturbank	Gelaire Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Arbeit mit den humanen Medulloblastom- Zelllinien DAOY, D-341, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow

Werkbank. Die Zellen wurden bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und einem Sauerstoffpartialdruck von 5% CO₂ kultiviert. Die adhärenenten Zelllinien DAOY, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 wuchsen in T75-, die Suspensionszellen D-341 in T25-Flaschen. Kultiviert wurden alle Zelllinien in RPMI Medium (mit 10% FCS und 1% Pen/Strep). Die ONS-76 erhielten zusätzlich 1% L-Glutamin 200 nM, die HD-MB3 NEAA (1%).

Ein Aufteilen der Zellen von einer auf mehrere Flaschen erfolgte alle 2-3 Tage abhängig von der Konfluenz der Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit 0,2% Trypsin/EDTA abgelöst, gezählt, für 5 Minuten bei 800 rpm (die D-341 bei 1000 rpm) zentrifugiert und entsprechend den erforderlichen Verdünnungen ausgesät und weiter kultiviert.

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in FCS mit 10% DMSO. Gelagert wurden die Kryoröhrchen bei -80°C. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen ca. 3 Minuten bei 37°C inkubiert, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert.

3.2.2 Mikroskopische Aufnahmen von Zellen

Mikroskopische Aufnahmen von den Zellen wurden in T25- Zellkulturflaschen 24 Std., 48 Std. und 72 Std. nach Aussaat und RITA- bzw. EtOH- Behandlung mit dem Axiovert 40CFL Mikroskop (Carl Zeiss *Microscopy* GmbH) unter Verwendung der Software ZEN erstellt. Die Fotos wurden als TIF exportiert.

3.2.3 Zellviabilitäts- Assay

Die Zellviabilität wurde anhand des MTT-Assays gemessen. Er dient der Quantifizierungsbestimmung der Zellen unter Behandlung dieser mit Chemikalien bzw. Medikamenten. Dabei wird der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) bei seiner Reduktion zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazansalz umgewandelt, so dass die metabolische Aktivität von Zellen anhand der Reduktion des Farbstoffs bestimmt werden kann (Mosmann 1983). Die Reduktionsrate hängt vom Stoffwechsel der Zellen ab und wird definiert als ihre Zellviabilität.

Der Versuch wurde im 96-*well* Format jeweils in 3-fach Bestimmung nach 24 Std., 48 Std. und 72 Std. Behandlung mit RITA/EtOH durchgeführt. Der Farbstoff MTT (Konzentration 6 mg/ml) wurde in PBS gelöst (10 mM) und 20 µl pro *well* zu den Zellen gegeben (Endkonzentration 1,7 mM). Nach einer Inkubationszeit von 4 Std. bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Formazan in 100 µl Solubilisierungslösung gelöst. Die Platten wurden bis zur Auswertung bei -20°C gelagert und zur Auswertung zunächst ca. 3 Std. bei Raumtemperatur auf einem Schüttler erwärmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im Epoch Spektralphotometer (BioTech). Alle Experimente wurden mindestens drei Mal in jeweils dreifach Bestimmung durchgeführt.

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀), welche die Konzentration angibt, unter der das Wachstum von 50% der Zellen inhibiert wird, wurde Mithilfe der GraphPadPrism- Software für die jeweiligen 72 Std.- Werte berechnet.

3.2.4 Apoptose- Assay

Zellen, die durch Apoptose sterben, geben Mono- und Oligonukleosome ins Zytoplasma ab. Mit dem Cell Death Detection ELISAPlus KIT kann man diese abgegebenen Mono- und Oligonukleosome mittels speziell gegen DNA und Histone gerichteter Antikörper detektieren. Die Fraktion apoptotischer Zellen korreliert mit der Umsetzung eines spezifischen Substrates. Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte nach Herstellerangaben im 96-*well* Format.

Dieses Experiment wurde bei den adhärenenten Medulloblastomzelllinien nach je 24, 48 und 72 Std. Inkubation mit RITA/EtOH durchgeführt und die Messung erfolgte mit dem Epoch Spektralphotometer (BioTech) bei einer Wellenlänge von 405nm. Alle Experimente wurden drei Mal, jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.2.5 Proliferations- Assay

Das Zellproliferationsassay (ELISA) ist eine indirekte Methode die Zellproliferation zu bestimmen, indem man die Syntheseleistung der DNA misst. Dieses Experiment basiert auf dem Einbau des BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) anstelle von Thymidin in die genomische DNA von proliferierenden Zellen. Das eingebaute BrdU wird mittels eines Antikörpers gebunden. Aufschluss über die Proliferationsrate gibt nun die Umsetzung des Substrats in jeder Probe.

Dieses Experiment wurde bei den adhärenenten Medulloblastomzelllinien nach je 24, 48 und 72 Std. Inkubation mit RITA/EtOH und nach Herstellervorgaben im 96-well Format durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem Epoch Spektralphotometer (BioTech) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Alle Experimente wurden drei Mal, jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.2.6 Zellzyklusanalyse

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert. Bei der Zellzyklusanalyse untersucht man anhand der Durchflusszytometrie den DNA-Gehalt von Zellen. Dieser gibt wiederum Aufschluss über den Zellzyklusstatus von Zellen. Die sub G1-Phase ist charakterisiert durch degradierte DNA und damit ein Charakteristikum apoptotischer Zellen. In der G1-Phase liegt in der Zelle ein vollständiger Chromosomensatz vor. Befindet sich eine Zelle in der S-Phase, in der die DNA repliziert wird, liegt ein 1-2-facher Chromosomensatz vor. Die G2/M-Phase ist durch das Vorhandensein zweier Chromosomensätze charakterisiert.

In diesem Versuch wurden die fünf Medulloblastom- Zelllinien in T25-Zellkulturflaschen kultiviert und nach 24 Std., 48 Std. und 72 Std. RITA- /EtOH-Behandlung untersucht. Die durch Abschaben vom Flaschenboden gewonnenen Zellpellets wurden mit PBS gewaschen (5 Min. bei 1000 rpm, in 70% Ethanol auf Eis für 1 Std. fixiert und anschließend zentrifugiert (5 Min. bei 1000 g). Das Pellet wurde in 500µl PBS resuspendiert und die RNA durch Zugabe von RNase A (Endkonzentration 0,25 mg/ml) für 1 Std. bei 37°C verdaut. Propidiumiodid wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Der zelluläre DNA- Gehalt

wurde mittels des Flow Cytometers FC 500 gemessen und anhand der Software CXP analysiert.

Alle Experimente wurden drei Mal, jeweils in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

3.2.7 Transfektion von HD-MB3

Die zu transfizierenden Zellen wurden zunächst trypsinisiert, zweifach mit PBS gewaschen und gezählt. Es wurden $2-3 \cdot 10^6$ Zellen in Opti-MEM – Medium (Invitrogen) aufgenommen und in Elektroporationsküvetten überführt. Es wurden 3 µg des Plasmids pMSCV-puro-dnp53 (kodiert für dominant negatives *p53*, siehe 3.1.1) zum Ansatz gegeben, mittels pipettieren gemischt und bei 200 V 20 ms mit dem Gene Pulser Xcell (BioRad) elektroporiert. Anschließend wurde der Ansatz in RPMI-Medium (ohne PenStrep) aufgenommen und auf eine T25-Flasche gegeben. Nach 24 Std. erfolgte der erste Mediumwechsel mit komplettem RPMI-Medium und 1 µg/ml Puromycin. Die Zellen wurden solange durch die Gabe von Puromycin selektioniert bis die Kontrollgruppe (gleicher Ansatz, aber mit einem pMSCV-Vektor ohne Puromycin-Resistenz) komplett gestorben war.

Die Transfektion wurde in dieser Arbeit an HD-MB3-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurden vorhandene (bereitgestellt aus unserer Gruppe von Annette Künkele, (Künkele, De Preter et al. 2012)), mit dem gleichen Vektor transfizierte ONS-76 Zellen genutzt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung ihrer

Konzentration

Zellpellets bzw. Tumorgewebe wurden zunächst 30 Min. auf Eis in RIPA Puffer lysiert. Nach einer Zentrifugation von 14.000 rpm für 30 Min. wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode. Dabei nutzt man die Tatsache, dass sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford 1976). In dieser Arbeit wurden 998 µl 1x Roti®- Quant mit 2 µl des zu analysierenden Proteinlysats vermischt und die Absorption nach einer 5- minütigen Inkubationszeit am NanoDrop 2000c gemessen und gegen den Leerwert, der kein Proteinlysat enthielt, normalisiert. Anhand einer BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

Nachfolgend ist das Pipettierschema einer solchen Bradford- Proteinbestimmung aufgelistet:

Tab. 14 Pipettierschema für die Standardreihe mit BSA (10 mg/ml)

Konzentration [µg/µl]	0	1	3	5	7	9	10
BSA [µl]	0	2	6	10	14	18	20
Aqua dest [µl]	50	48	44	40	36	32	30

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in Doppelbestimmung und der daraus gebildete Mittelwert wurde für die weiteren Versuche verwendet.

3.3.2 Elektrophorese von Proteinen

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE) werden Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch den Zusatz von SDS wird die Eigenladung der Proteine von einer konstanten negativen Ladung überdeckt. Die Linearisierung der Proben erfolgt durch Erhitzen auf 95°C, wobei die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch die Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden. Die Proben werden dann auf ein SDS- Gel aufgetragen, wobei kleinere Proteine im elektrischen Feld schneller durch das Gel wandern als größere. Dies führt zur Auftrennung der

Proteine. Anhand eines Molekulargewichtsstandards kann die Proteingröße nach Färbung mit einem Farbstoff abgeschätzt werden (Schagger and von Jagow 1987).

In dieser Arbeit wurden je 50 µg Gesamtprotein mit Laemmli-Puffer versetzt, 5 Min. bei 95°C im Heizblock denaturiert und auf *NuPAGE*® Gele (Invitrogen) aufgetragen. In eine Tasche wurde zusätzlich der Molekulargewichtsstandard *Page Ruler* aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 120 V je nach Laufweite der Farbfront für 90-120 Min.

3.3.3 Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Western Blot ist eine proteinbiochemische Methode, mit der Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert werden können (Burnette 1981). Die Proteine wandern dabei durch ein senkrecht zum SDS-Gel angelegtes elektrisches Feld in Richtung der Anode auf die Membran, auf der sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Das an den Proteinen angelagerte SDS wird ausgewaschen, wodurch die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder annehmen können. Freie unspezifische Bindungsstellen der Proteine werden mithilfe einer Lösung aus entfettetem Milchpulver blockiert. Die Detektion bestimmter Proteine kann mit spezifischen Primärantikörpern erfolgen, die an ihr Antigen binden. Mittels eines Sekundärantikörpers, der spezifisch an den primären Antikörper bindet wird die Proteinbande visualisiert. Dies gelingt, da der Sekundärantikörper zusätzlich ein Reporterenzym enthält, welches das Substrat Luminol umsetzt.

In dieser Arbeit wurden aufgetrennte Proteine mittels des Trans-Blot® Turbo™ vom SDS-Gel auf die *Hybond-™C Extra* Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurden zuerst zwei Filterpapiere (Whatman) mit Anodenpuffer 1 getränkt und in der Blotkammer übereinander gelegt. Ein weiteres Filterpapier, mit Anodenpuffer 2 getränkt, wurde auf die beiden Filterpapiere gelegt. Als nächstes wurde die Membran ebenfalls in Anodenpuffer 2 getränkt und das SDS-Gel, welches mit Kathodenpuffer getränkt war, aufgestapelt. Zum Abschluss wurden drei weitere

Filterpapiere, die ebenfalls im Kathodenpuffer getränkt sind, auf dem Stapel positioniert. Bei einer konstanten elektrischen Stromstärke von 90 mA wurden die Proteine für 1 Std. übertragen.

Die Membran wurde mit PBS- $T_{0,2}$ gewaschen und die Proteine auf der Membran mit PonceauS- Lösung zur Überprüfung des Transfers und zur Einzeichnung der Markerbanden angefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS- $T_{0,2}$ wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen 1 Std. mit BLOTTO blockiert. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation bei 4°C mit dem Primärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde, nachdem die Membran dreimal mit BLOTTO gewaschen wurde (1 Min., 5 Min., 25 Min.) für 1 Std. bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Es folgten die gleichen Waschschriffe mit BLOTTO, die bei dem Waschvorgang nach dem Primärantikörper durchgeführt wurden. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper sind tabellarisch unter 3.1.6 aufgeführt. Die Proteine wurden schließlich mittels des Detektionsreagenz ECL Plus TM visualisiert und im FusionFX (Peqlab) detektiert. Die Bilder wurden als jpeg exportiert und mit Adobe Photoshop (Version CS4) ausgewertet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Die Messung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch mittels des NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine wurden bei 280 nm detektiert. Der Quotient aus der OD_{260} und der OD_{280} liegt bei reinen DNA-Präparationen bei 1,8 und bei reinen RNA-Präparationen bei 2,0. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur reine Nukleinsäure-Präparationen weiter verwendet.

3.4.2 mRNA- Isolierung

Zur Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real- Time- PCR wurde RNA aus Zellen oder Gewebe extrahiert. Zur Extraktion von RNA aus Zellkulturen wurden diese in T25- Zellkulturflaschen kultiviert. Adhärenente Zellen wurden mit 500 µl Qiazol und mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst. Suspensionszellen wurden abzentrifugiert und durch die Zugabe von 500 µl Qiazol Lysis- Reagent lysiert. In dieser Arbeit wurden RNA aus fünf Medulloblastom- Zelllinien 24 Std., 48 Std. und 72 Std. nach RITA-Behandlung sowie unbehandelten Kontrollen isoliert. Alle weiteren Schritte wurden mit dem miRNeasy Kit (Qiagen) inklusive des optionalen DNase- Verdaus mittels RNase-freier DNase (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte mRNA wurde schließlich bei -80°C gelagert.

3.4.3 Reverse Transkription von komplementärer DNA aus isolierter mRNA

Bei der Reversen Transkription (RT) wird mRNA unter Verwendung des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Ausgehend von der cDNA können dann weitere Analysen wie quantitative oder semiquantitative PCR durchgeführt werden. Die Reverse Transkription erfolgte in dieser Arbeit unter Benutzung des SuperScript® II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Die cDNA wurde nach Herstellerangaben erzeugt und bei -20°C gelagert.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

1985 wurde das Prinzip der Polymerase- Kettenreaktion (PCR) von Saiki *et al.* entwickelt, mittels der DNA- Sequenzen vervielfältigt werden können (Saiki, Gelfand et al. 1988). In einem Puffersystem werden die Ausgangs-DNA (*template*), zwei spezifische Oligonukleotidprimer, eine thermostabile Taq- Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) vermischt. Die PCR erfolgt in drei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt, dem Denaturierungsschritt (94°C), wird das *template* in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt, an welche die spezifischen

Oligonukleotidprimer im Annealingschritt hybridisieren. Im letzten Schritt, dem Elongationsschritt, bei dem die Polymerase aus dem gebundenen Primer das *template* neu synthetisiert, findet beim Temperaturoptimum der Polymerase statt (72°C). Jede PCR besteht aus 25-40 Zyklen, wobei die Menge des eingesetzten *templates* bei optimalen Bedingungen in jedem Zyklus verdoppelt wird.

In dieser Arbeit wurde die Methode der PCR zur Überprüfung des Einfügens des *p53*- Plasmides in Medulloblastomzellen genutzt, wobei die GoTaq® *Hot Start* Polymerase (Promega) Verwendung fand. Die Stocklösung der Primer hatte eine Konzentration von 20 mM.

Folgendes Pipettierschema wurde für jeden PCR-Ansatz verwendet:

5x GoTaq® Flexi Puffer	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
dNTP- Mix (Bio- Budget, Krefeld)	0,6 µl
Primer <i>forward</i>	1 µl
Primer <i>reverse</i>	1 µl
GoTaq® Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
<i>template</i> DNA	1 µl
DNase- freies H ₂ O	11,1 µl

Die Amplifikation der *templates* erfolgte im C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad), wobei die Annealingtemperatur vom GC-Gehalt der verwendeten Primer und die Elongationszeit von der Länge des zu synthetisierenden DNA- *templates* (60 Sek. pro 1 kb) abhängig war. In Tabelle 13 sind die verwendeten Primer, ihre Basenpaarlänge und ihre Annealing- Temperatur angegeben.

Tab. 15 Verwendeter Oligonukleotidprimer für PCR

Primer	Annealing Temp.	Produktlänge	Sequenz (5'-3')
pMSCVpuro	57°C	172 bp	CCCTTGAACCCTCCTCGTTTCGACC
SCV puro p53 dd	37°C	6295 bp	CCCTTGAACCCTCCTCGTTTCGACC

Folgendes allgemeines Programm wurde benutzt:

180 Sek.	94°C	
30 Sek.	94°C	} 39x
30 Sek.	37-57°C	
30-180 Sek.	72°C	
300 Sek.	72°C	

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels der Agarose- Gelelektrophorese, wobei jeweils 14 µl des PCR- Ansatzes aufgetragen wurden.

3.4.5 Quantitative PCR

Bei der Methode der quantitativen PCR, die im Prinzip der herkömmlichen PCR entspricht, wird bei jedem Amplifikationszyklus der Zuwachs des Reaktionsproduktes (im Falle von cDNA als Template: die Transkription spezifischer Gene) gemessen. Dazu wird dem konventionellen PCR- Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, der in die doppelsträngige DNA interkaliert, während diese amplifiziert wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt hierbei proportional zur vorhandenen DNA- Menge zu und wird mittels einer Detektionseinheit im real-time Thermozykler (StepOne plus) gemessen. Die Anzahl der Zyklen, bei der die gemessene Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird CT- Wert genannt.

In dieser Arbeit wurde cDNA, die aus isolierter mRNA synthetisiert wurde, mit SYBR Green (Fast SYBR® Green Master Mix, Life Technologies) quantifiziert. Dazu

wurde die qPCR auf einem StepOnePlus™ Real- Time PCR Systems (Life Technologies) durchgeführt. Der Ablauf des Programmes war wie folgt:

20 Sek.	95°C,	} 40x
3 Sek.	95°C,	
30 Sek.	60°C.	

Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind tabellarisch zusammengefasst (Tab. 10).

Der CT- Wert der zu analysierenden cDNA wurde gegen den des ubiquitär-exprimierten Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

3.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Da sowohl DNA- als auch RNA-Stränge negativ geladen sind, bewegen sie sich in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit von Nukleinsäure-Strängen in Agarosegelen korreliert mit der Fragmentgröße, da Agarosegele eine siebartige Struktur aufweisen und kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand bieten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1-2%-ige Agarosegele benutzt, die in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) angesetzt wurden. Ethidiumbromid (Endkonzentration 1,25 µM), ein Farbstoff, dessen Absorptionsspektrum sich bei Interkalation mit Nukleinsäuren verändert, diente zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht und wurde dem Puffer hinzugefügt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde parallel zu den zu analysierenden Proben ein DNA- Standard (*LifeTechnologies*) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Tris- Acetat- EDTA- Puffer bei 120 V für 45 bis 60 Min. und die Visualisierung am Dokumentationsgerät *Biodoc Analyzer* (Biometra).

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Xenografts

Weiblichen 6 Wochen alten thymuslosen NCR (nu/nu) Mäusen wurden subkutan in die linke Flanke $1 \cdot 10^7$ HD-MB3- Zellen, die in je 200 μ l Matrigel™ (BD) aufgenommen wurden, injiziert.

Mithilfe einer elektronischen Schieblehre (Obi) wurden die Tumoren drei Mal pro Woche vermessen und das Volumen mittels folgender Formel abgeschätzt:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{1}{2} \cdot \text{Länge [mm]} \cdot \text{Breite [mm]} \cdot \text{Höhe [mm]}$$

Sobald die Tumoren ein Volumen von ca. 200 mm³ erreicht hatten, wurden die Mäuse randomisiert einer Behandlungs- und einer Kontrollgruppe zugewiesen. In der Behandlungsgruppe erhielten die Mäuse alle 24 Std. intraperitoneal jeweils 3 mg RITA/kg Maus/d. Da sich RITA in der notwendigen Dosis für die Mäuse nicht gut in EtOH lösen ließ, wurde RITA *in vivo* in DMSO gelöst. Daher erhielten die Mäuse in der Kontrollgruppe die entsprechende Menge DMSO in PBS gelöst. Beim Erreichen einer definierten Endgröße der Tumoren von 1500 mm³ wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Zusätzlich wurde ein Versuch mit einer Intensivbehandlung durchgeführt: Hierfür wurden weiblichen 6 Wochen alten thymuslosen NCR (nu/nu) Mäusen subkutan in die linke Flanke $1 \cdot 10^7$ HD-MB3- Zellen, die in je 200 μ l Matrigel™ (BD) aufgenommen wurden, injiziert. Ab einem Tumolvolumen von ca. 500 mm³ begann die Intensivbehandlung der Mäuse. Diese erfolgte alle 12 Stunden mit 6 mg RITA/kg Maus/d über einen Zeitraum von insgesamt 72 Std. Die höhere Dosis wurde eingesetzt, um eindeutige Effekte auf Änderungen von Proteinexpressionen und Viabilität zu erhalten. Anschließend wurden die Tumoren dieser Tiere entnommen, in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, um sie für weitere Experimente (Western Blots, qPCR und immunohistochemische Färbungen) zu nutzen.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1. Histologische und immunohistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

In der Histologie wird die Hämatoxylin- Eosin- Färbung angewendet, um verschiedene Strukturen von Gewebeschnitten anzufärben. Hämalaun färbt saure Strukturen wie DNA und Ribosomen blau, während Eosin basische Strukturen wie Plasmaproteine und Mitochondrien rot erscheinen lässt. Markierte Antikörper werden in der Immunhistochemie benutzt, um Proteine in Gewebeschnitten sichtbar zu machen.

Formalin- fixierte Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung der Antigene erfolgte mittels der „Target Retrieval Solution“ (Dako) bei pH 6 für 20 Min. bei 100°C. Die Schnitte wurden anschließend 20 min gekühlt und für 5 min in 3% H₂O₂ inkubiert. Im Dako Autostainer (Dako) wurden die verschiedenen Antikörper (Tab. 8) nach Herstellerangaben inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels des EnVision™ Kits (Dako). Die immunohistochemischen Untersuchungen von Geweben wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Lukas Heukamp (Institut für Pathologie, Universitätsklinik Köln) durchgeführt.

3.7 Statistische Methoden und Bildbearbeitung

3.7.1 Statistische Analysen

Sämtliche Graphen wurden mit *GraphPad Prism*® 5.0 erstellt. Statistische Analysen wie Student's t- Test, Log- Rank- Test und Wilcoxon Test erfolgten ebenfalls mittels dieser Software. Expressionsdaten aus qPCR- Analysen einzelner mRNAs wurden mit *Biogazelle qbasePLUS 2.0* berechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei experimentell verschieden behandelten Gruppen wurde mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) und *** (p < 0,001) gekennzeichnet.

3.7.2 Bildbearbeitung

Eingescannte histologische Schnitte wurden mit *Panoramic Viewer* 1.15.2 analysiert und als TIF-Dateien exportiert. Die Qualität von Fotos und anderen Dateien wurde mittels der Software Photoshop® CS4 (Adobe) sinnerhaltend aufgewertet. Die immunhistochemischen Auswertungen wurden mit dem Image J Programm durchgeführt. Hierfür wurden die Bilder in definierter Größe (siehe Maßstabsbalken) nach der absoluten Anzahl an positiv gefärbten Zellen gezählt und miteinander verglichen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zellbiologische Untersuchungen

4.1.1 Mikroskopische Aufnahmen von Zellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Behandlung mit RITA auf die verschiedenen Medulloblastomzelllinien hat, wurden diese mit RITA (Endkonzentration 1 μM) bzw. mit Ethanol (Endkonzentration 1 μM) behandelt. Unter dem Mikroskop sind bereits nach 24 Std. Auswirkungen auf die Zelllinien aufgrund einer Behandlung mit RITA zu erkennen (Abb. 4). Exemplarisch werden hier Fotos der Zelllinien nach 48 Std.- RITA- bzw. Ethanol- Behandlungszeit gezeigt, da zu diesem Zeitpunkt der Effekt der reduzierten Konfluenz bei den RITA-sensiblen Medulloblastomzellen, HD-MB3 und DAOY am deutlichsten war. ONS-76 zeigten eine um ca. 50% reduzierte Konfluenz, während man bei UW-228 keine Unterschiede der Konfluenz zwischen mit RITA und Ethanol- behandelten Zellen erkennen.

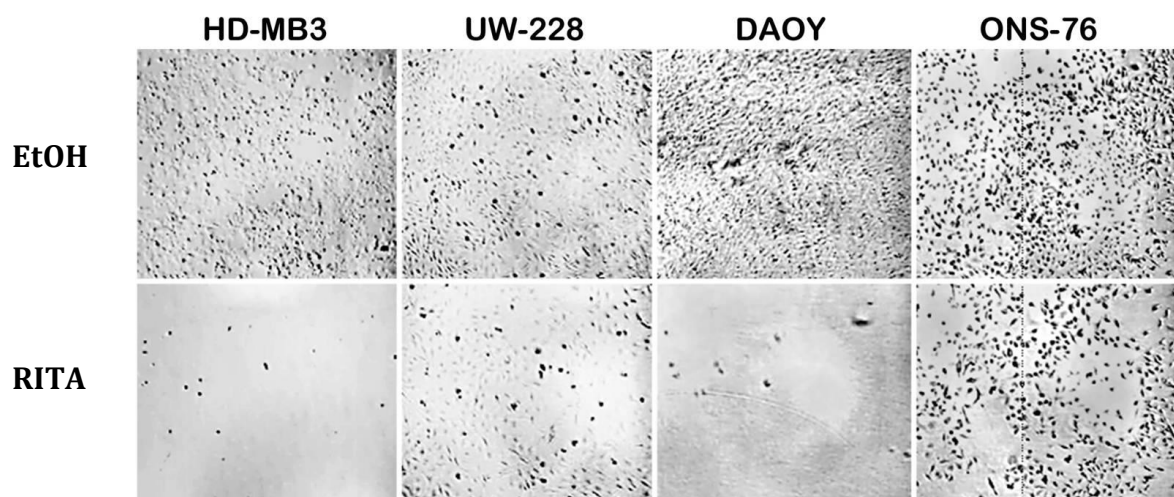


Abb. 4 Reduzierte Konfluenz von Medulloblastomzellen nach RITA- Behandlung
Mikroskopische Aufnahmen von Medulloblastomzellen 48 Std. nach RITA- bzw. Ethanol (EtOH)- Behandlung. Vergrößerung: 10-fach

4.1.2 Effekte der RITA- Behandlung auf die Zellviabilität von Medulloblastomzellen mit (DAOY, UW-228) und ohne p53-Mutation (D-341, HD-MB3, ONS-76)

Davon ausgehend, dass RITA die p53- MDM-2- Bindung blockiert wurde zunächst der Effekt RITAs auf die Zellviabilität untersucht. Dafür wurden die Zelllinien DAOY, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 in unterschiedlicher Dichte ausgesät (Tabelle 14) und mit verschiedenen Konzentrationen an RITA behandelt. Die Zellviabilität wurde nach 24, 48 und 72 Std. gemessen. Verglichen wurde die Viabilität der mit RITA behandelten Zellen mit der Viabilität der Zellen, die mit der entsprechenden Dosis Ethanol behandelt wurden.

Tab. 16 zeigt die ausgesäten Zellzahlen für die jeweiligen Medulloblastomzellen.

Tab. 16 Übersicht über die jeweils ausgesäten Zellzahlen für die 96-well Platte

Zelllinie	Zellzahl für 96-well
DAOY	$7,5 \cdot 10^3$
HD-MB3	$2 \cdot 10^4$
ONS-76	$5 \cdot 10^3$
UW-228	$7,5 \cdot 10^3$

Zunächst wurden das Ansprechen von Zelllinien mit Wt p53 geprüft. Für die einzelnen Zelllinien wurden spezifische RITA- Konzentrationen eingesetzt, da sich nach dem ersten Versuch μM - Konzentration für alle zu verwenden, schnell zeigte, dass die Zelllinien zu unterschiedlich auf RITA reagieren. Am empfindlichsten reagierten HD-MB3, deren IC_{50} unter RITA- Behandlung bei $19,4 \text{ nM} (\pm 6,4 \text{ nM})$ nach 72 Std. lag (siehe Abb.10). Insgesamt reagieren die HD-MB3 sehr schnell auf die RITA- Behandlung, so dass bereits nach 24 Std. Behandlung mit RITA kaum noch vitale Zellen vorhanden sind (Abb. 5).

Die ONS-76 reagieren, trotz ihrer vergleichsweise höheren IC_{50} unter RITA- Gabe ($2,4 \mu\text{M} \pm 0,4 \mu\text{M}$), nach 72 Std. deutlich auf eine Behandlung mit RITA (Abb. 6).

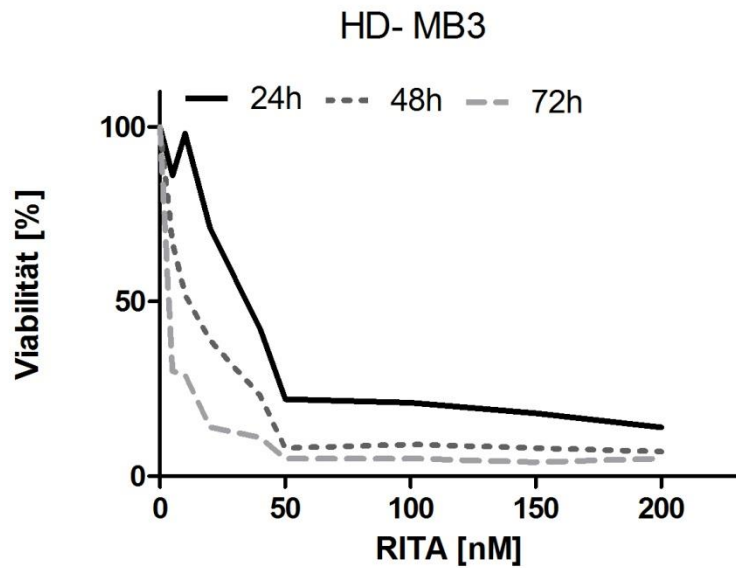


Abb. 5 Reduktion der Zellviabilität der HD-MB3 durch RITA- Behandlung gemessen mittels MTT 24 Std., 48 Std. und 72 Std. nach 0- 200 nM RITA- Behandlung. Viabilität ist gegen RITA Konzentration aufgetragen.

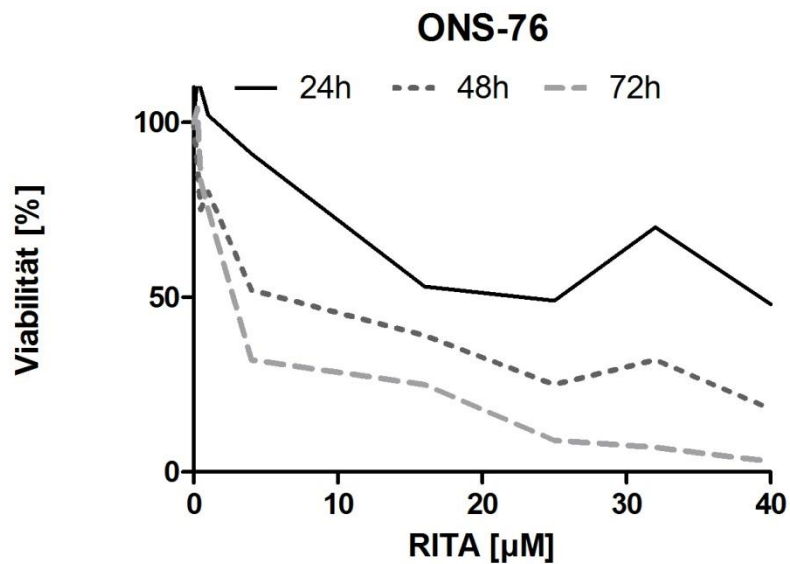


Abb. 6 Reduktion der Zellviabilität der ONS-76 durch RITA Behandlung gemessen mittels MTT 24 Std, 48 Std und 72 Std nach 0- 40 µM RITA- Behandlung.

Die D-341 haben ebenfalls keine *p53*- Mutation. RITA hatte erst ab hohen μM -Konzentration einen Effekt auf die Viabilität der D-341 ($\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{M} \pm 2,4 \mu\text{M}$). Die Kurven verlaufen zu allen drei Behandlungszeitpunkten nahezu horizontal (Abb. 7). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Suspensionszellen generell im MTT- Assay eine größere Schwankungsbreite aufweisen, da sie nicht wie adhärenente Zellen am Plattenboden anwachsen, sondern durch ihre Suspensionseigenschaft zentrifugiert werden müssen um zunächst das Medium absaugen und dann die Solubilisierungslösung auftragen zu können. Hierbei hat man keine Kontrolle, ob wirklich der Großteil der Zellen einer bestimmten Konzentration nach der Zentrifugation nicht mehr im Medium schwimmt.

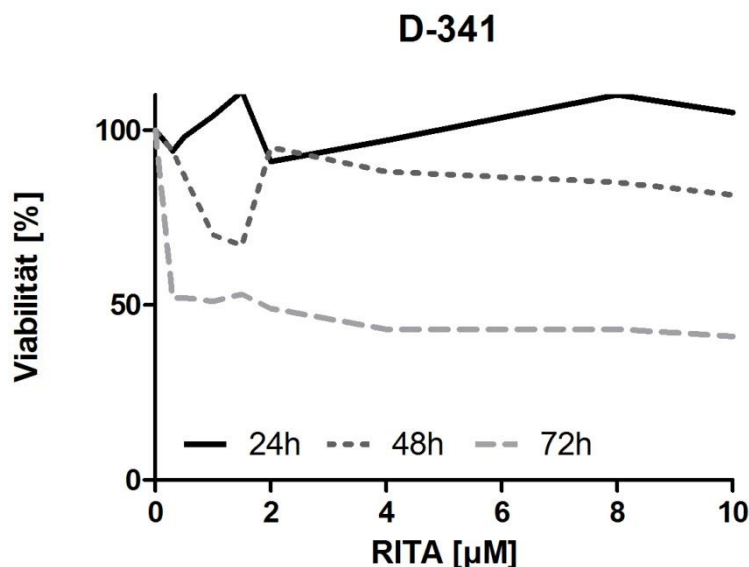


Abb. 7 Zellviabilitätsassay der D-341 gemessen mittels MTT 24 Std, 48 Std und 72 Std nach 0- 10 μM RITA- Behandlung.

Im Vergleich hierzu zeigten auch Zellen mit mutiertem *p53* eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit RITA.

Die DAOY- Zellen erreichen ihre IC_{50} bei 93,9 nM ($\pm 4,9 \text{ nM}$) unter RITA-Behandlung nach 72 Std. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Graphen fällt auf, dass die DAOY- Zellen nahezu linear auf die RITA Behandlung reagierten, unabhängig davon, wie lange die Zellen behandelt wurden (Abb. 8).

Anders verhält es sich bei den UW-228- Zellen. Hier ist zu allen drei Messpunkten zunächst ein Plateau unter der Gabe von 0- ca. 2 μM RITA zu erkennen, bei dem sich nicht viel an der Viabilität der Zellen ändert. Erst bei Überschreiten eines Schwellenwertes von 2 μM RITA- Gabe sinkt die Zellviabilität (Abb. 9). Die IC_{50} der UW-228 Zellen liegt unter RITA- Behandlung nach 72 Std. bei 5,4 μM ($\pm 0,2$ μM).

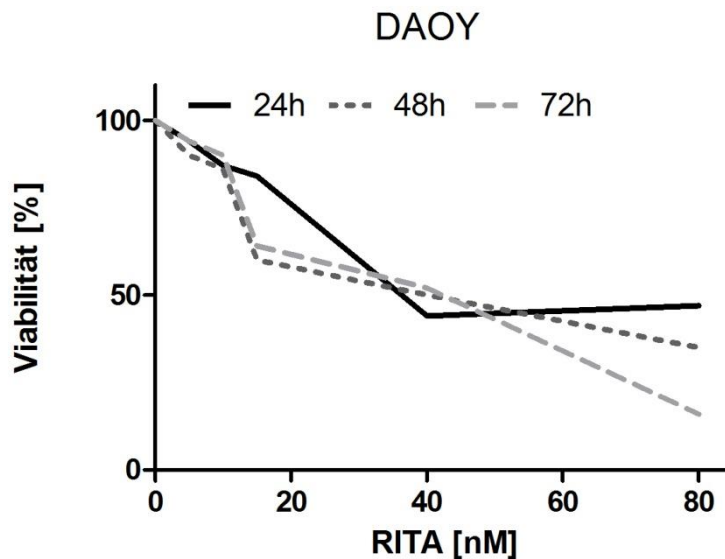


Abb. 8 Reduktion der Zellviabilität von DAOY Zellen nach RITA- Behandlung, gemessen mittels MTT 24, 48 und 72 Std. nach Behandlung mit 0-80 nM RITA.

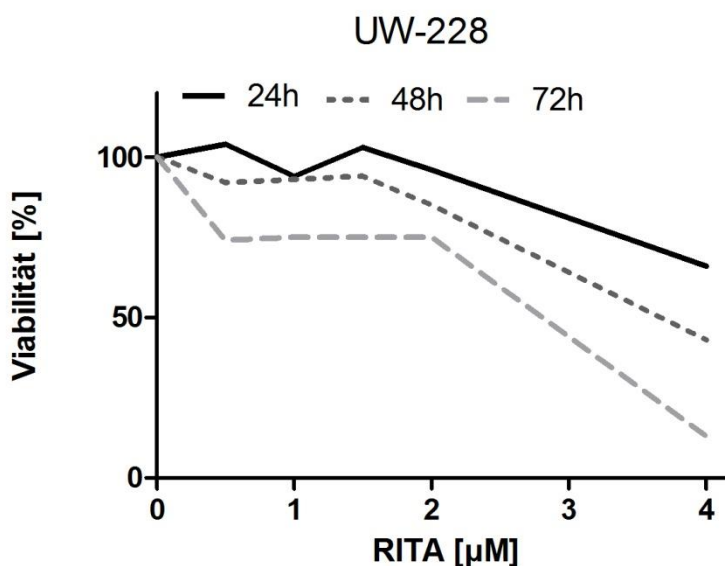


Abb. 9 Reduktion der Zellviabilität UW-228 Zellen durch RITA gemessen mittels MTT 24 Std., 48 Std. und 72 Std. nach 0- 4 μM RITA- Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Unterschied in der Viabilität nach der Behandlung der Zelllinien mit RITA nicht abhängig von deren *p53*- Status ist (Abb. 10).

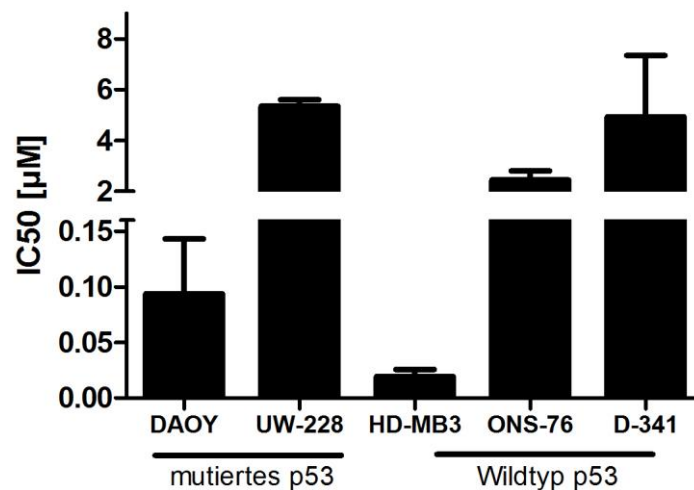


Abb. 10 Alle IC50s der fünf Medulloblastomzelllinien im Überblick nach 72 Std- RITA Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen von je mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Nach dem Erheben dieser Ergebnisse wurde die Dosis für alle Zelllinien während der weiteren Experimente auf eine Endkonzentration von 1 µM RITA festgelegt. Somit wird bei den auf RITA- sensiblen Zelllinien HD-MB3 und DAOY ein sehr starker Effekt und bei den D-341, UW-228 und den ONS-76 kein bzw. ein gering ausgeprägter Effekt aufgrund einer RITA- Behandlung erwartet.

4.1.3 Auslösen der Apoptose durch RITA- Behandlung

Als nächstes sollte der Apoptoseanteil in den mit RITA behandelten Medulloblastom- Zelllinien bestimmt werden. Dafür wurden die Tumorzellen mit 1 µM RITA und die Apoptoserate nach 24, 48 und 72 Std mittels eines ELISAs (siehe 3.2.4) bestimmt. Im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Kontrollen

induzierte RITA bereits nach 24 Std. eine vermehrte Apoptose (Abb. 11). Die Apoptoserate war in DAOY 1,7-fach, in ONS-76 1,7-fach und in HD-MB3 2,0-fach zu den mit Ethanol behandelten Zellen erhöht. Bei den UW-228 zeigte sich keine Erhöhung der Apoptoserate (Faktor 1,04). Signifikant erhöht war der Anteil an apoptotischen bzw. toten Zellen bei den HD-MB3 nach sowohl 24 Std. (student's t-test **: $p = 0,006$) (als auch 72 Std (student's t-test **: $p = 0,008$)). Die Apoptoserate bei den HD-MB3 kann man nur nach 24 Std sinnvoll bestimmen, da bereits nach 24 Std. RITA- Behandlung nur noch wenig vitale Zellen vorhanden sind. Nach 48 Std. sind die Zellen nicht mehr apoptotisch sondern tot, so dass der Assay für HD-MB3 zu diesen Zeitpunkten keinen Informationsgehalt liefert. Ähnlich, aber nicht signifikant verhalten sich die DAOY. Wie nach vorherigen Versuchen nicht anders zu erwarten, sieht man bei den UW-228 keinen Effekt nach der RITA- Behandlung.

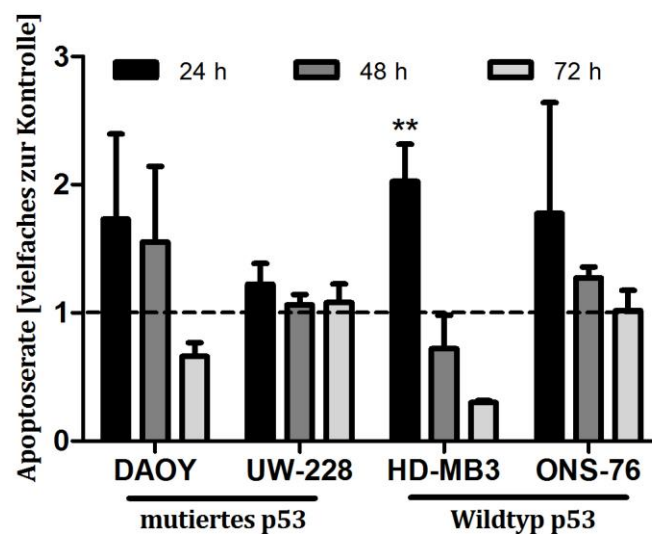


Abb. 11 Induktion von Apoptose nach RITA- Behandlung. Analyse der ausgelösten Apoptose durch RITA zu drei Zeitpunkten (24, 48, 72 Std.). Balkendiagramm der Zahl apoptotischer Zellen relativ zu den mit Ethanol behandelten Zellen, welche als Kontrolle dienen und somit gleich 1 gestzt sind. Gemessen mittels Cell Death ELISA. Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.1.4 Effekte der RITA- Behandlung auf die Proliferation

Maligne Zellen zeichnen sich durch ungehemmtes Wachstum bzw. ein unbegrenztes replikatives Potential aus. Wie sich die RITA- Behandlung auf die Proliferation der Medulloblastomzellen auswirkt, wurde mittels eines „Cell Proliferation ELISA“ (siehe 3.2.5) untersucht. Als Zelllinien wurden erneut die adhärent wachsenden DAOY, HD-MB3, ONS-76 und UW-228 gewählt und nach 24, 48 und 72 Std. die Proliferation gemessen. Es zeigte sich eine Abnahme der Proliferation der Medulloblastomzellen 72 Std. nach RITA- Behandlung. Bei den HD-MB3 war die Abnahme der Proliferation bereits nach 24 Std. ($61,3\% \pm 2,9\%$, $p = 0,0004$) und nach 48 Std. ($52\% \pm 4,0\%$, $p = 0,0009$) detektierbar. Die Zellproliferation nahm zusätzlich bei den DAOY ($60\% \pm 1,0\%$, $p = 0,01$) und den HD-MB3 ($67,3\% \pm 8,9\%$, $p = 0,0002$) nach 72 Std signifikant ab, während ein derartiger Effekt zum selben Zeitpunkt bei den UW-228 ($0\% \pm 1,6\%$, $p = 0,8$) und den ONS-76 ($21\% \pm 1,6\%$, $p = 0,07$) nicht zu verzeichnen war (Abb. 12).

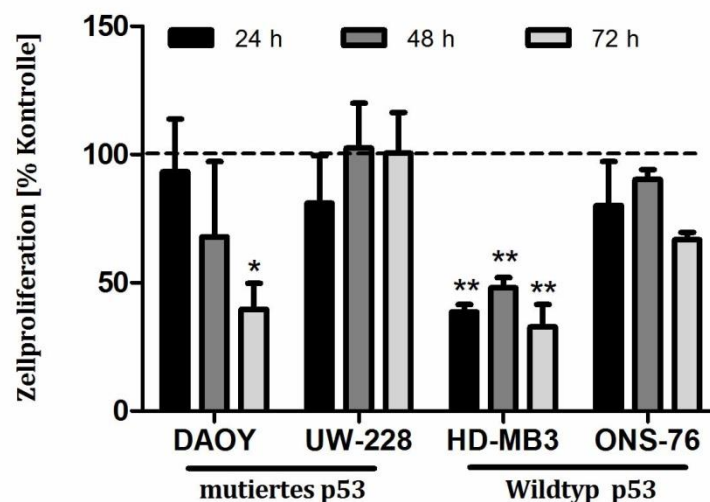


Abb. 12 Reduktion der Proliferation von Medulloblastomzellen nach RITA-Behandlung. Analyse der Zellproliferation nach RITA- Behandlung zu drei Zeitpunkten (24, 48, 72 Std.). Balkendiagramm der Zellproliferation in % relativ zur Kontrolle. Gemessen mittels ELISA- basierter BrdU Inkorporation. Student's t- Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.1.5 Zellzyklusanalyse

Die Wirkung einer RITA- Behandlung auf den Zellzyklus von Medulloblastomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Erneut wurden Proben der adhärennten Zelllinien für 24, 48 und 72 Std. mit RITA bzw. Ethanol behandelt. Nach 24- stündiger Behandlung mit RITA betrug der sub G1- Anteil bei den DAOY $30,5\% \pm 4,5\%$ (Ethanol-behandelte Zellen: $7,1\% \pm 1,9\%$; $p = 0,05$) und bei den HD-MB3 $67,44\% \pm 12,9\%$ (Ethanol-behandelte Zellen: $4,0\% \pm 1,3\%$; $p = 0,006$). Die ONS-76 zeigen einen signifikanten Anstieg der Zellen, die sich in der subG1- Phase befinden $12,9\% \pm 0,9\%$ (Ethanol-behandelte Zellen $2,6\% \pm 1,2\%$; $p = 0,009$). Bei den UW-228 ($G1=1,3\% \pm 0,9\%$) kam es im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Zellen ($0,9\% \pm 0,7\%$) zu keinem signifikanten ($p = 0,7$) Anstieg des sub G1- Anteils (Abb. 13).

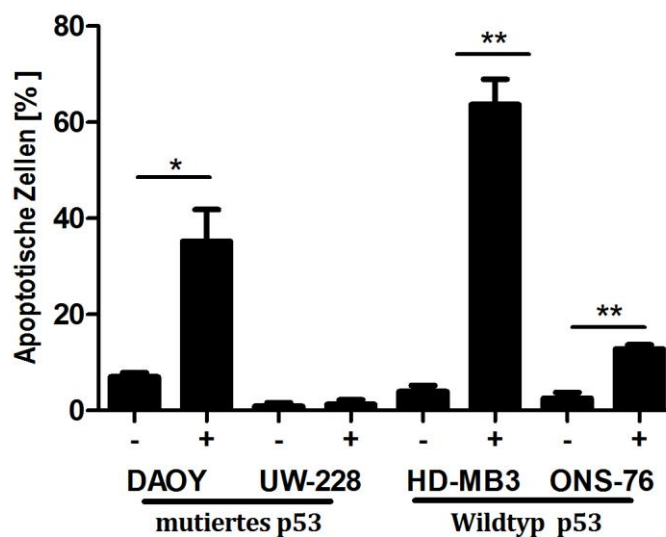


Abb. 13 Untersuchung der sub G1-Zellzyklusanteile bei Medulloblastomzelllinien nach RITA Behandlung Analysen 24 Std. nach RITA Behandlung (+) bzw. Ethanolbehandlung (-). Fraktionen von Zellen in der sub G1- Phase des Zellzyklus als Prozentbalken. Student's t- Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Für die Auswirkung einer RITA Behandlung auf die Verschiebung des Zellzyklus wird hier der 72 Std- Wert gezeigt, da er zu diesem Zeitpunkt seine maximale Ausprägung erreicht (Abb. 14). Betrachtet man die Zellzyklusphasen, in der sich die Zellen nach der RITA- Behandlung befinden, so kommt es bei den DAOY

($S=33,62\% \pm 4,6\%$; $p= 0,009$) und den ONS-76 ($S=31,32\% \pm 18,4\%$, $p= 0,04$) zu einem signifikanten Anstieg der Fraktion von Zellen in dieser Phase. Bei den ONS-76 steigt zusätzlich der Anteil von Zellen, die sich in der G2- Phase ($30,58\% \pm 4,3\%$) befinden. Die UW-228 zeigen auch bei der Durchflusszytometrie keinerlei Beeinflussung hinsichtlich ihres Zellzyklus durch eine RITA- Gabe. Die Messwerte der HD- MB3 nach 72- stündiger RITA- Behandlung kann man nicht werten, da zu diesem Zeitpunkt kaum noch viable Zellen vorhanden sind. Nach 24-stündiger RITA Behandlung zeigen die noch lebenden HD-MB3-Zellen keine signifikanten Veränderungen auf die S-Phase: die mit Ethanol behandelten Zellen zeigen $18,8\%$ ($\pm 12,5\%$) der Zellen in der S-Phase, die mit RITA- behandelten Zellen $13,3\%$ ($\pm 4,0\%$)(Abbildung nicht gezeigt). Diejenigen, die überlebt haben, könnten ähnlich der UW-228, unempfindlich gegenüber einer RITA- Behandlung in dieser Konzentration zu sein.

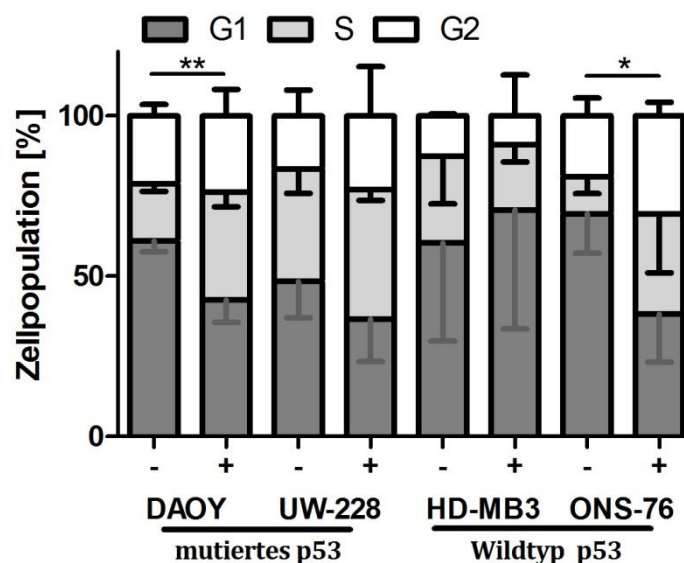


Abb. 14 Verschiebung des Zellzyklus von Medulloblastomzelllinien nach RITA-Behandlung. Zellzyklusanalysen der Medulloblastomzelllinien DAOY, UW-228, HD-MB3 und ONS-76 72 Std. nach RITA Behandlung bzw. Ethanolbehandlung mittels Durchflusszytometrie.. Fraktionen von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus als Prozentbalken. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.1.6 Transfektion von HD-MB3 und ONS-76 mit dominant negativem *p53*

Da in den vorangegangenen Experimenten deutlich wurde, dass RITA keinen Wirkunterschied zwischen mutierten und nicht-mutierten Zelllinien zeigt, wurde nun untersucht, ob der *p53*- Status wirklich nicht relevant für einen RITA- Effekt ist. Dafür wurde eine RITA- sensitive (HD-MB3) und - resistente (ONS-76) Zelllinie mit einem dominant negativen *p53* (dn *p53*) transfiziert. Dies sollte bei einem *p53*-statusabhängigen Wirkmechanismus von RITA zu einem Nichtansprechen unter der Behandlung führen.

4.1.6.1 PCR zur Überprüfung des eingebrachten Vektors

Um sicherzustellen, dass der Vektor tatsächlich in den HD-MB3 eingebracht wurde und diese Population demnach resistent gegenüber Puromycin ist, wurde eine PCR durchgeführt (Abb.15). Diese bestätigte die Anwesenheit des Vektors in den HD-MB3. Daher gingen wir davon aus, dass die untersuchten Zellen durch Anwesenheit des Vektors kein funktionsfähiges *p53* mehr besitzen. Die exakte Funktionalität des Vektors steht noch aus, dies wurde im Rahmen dieser Arbeit leider nicht geschafft, ist aber in Planung.

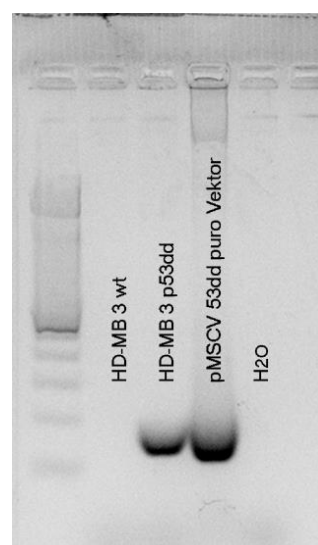


Abb. 15 PCR zur Überprüfung des eingebrachten Vektors um *p53* in den HD-MB3 auszuschalten. Die HD-MB3 dnp53 enthalten den dominant negativen *p53* Vektor. Bandengröße des Markers 6,3 kb. Die HD-MB3 nicht. Wasser als Negativkontrolle.

4.1.6.2 Wirkung von RITA auf Medulloblastomzelllinien mit dominant negativem p53

Acht Tage nachdem die Zellen mit dem dominant negativen *p53*- Vektor transfiziert wurden und eine Selektion durch Puromycin stattgefunden hatte, wurde erneut die Zellviabilität unter RITA-Behandlung mittels MTT gemessen. Bei den mit einem dominant negativen *p53*- transfizierten HD-MB3 (HD-MB3 dnp53) ändert sich die IC₅₀ nicht. Der Verlauf der Zellviabilität ähnelt sehr dem Verlauf der unmodifizierten HD-MB3 (Abb. 16 und vgl. Abb 5).

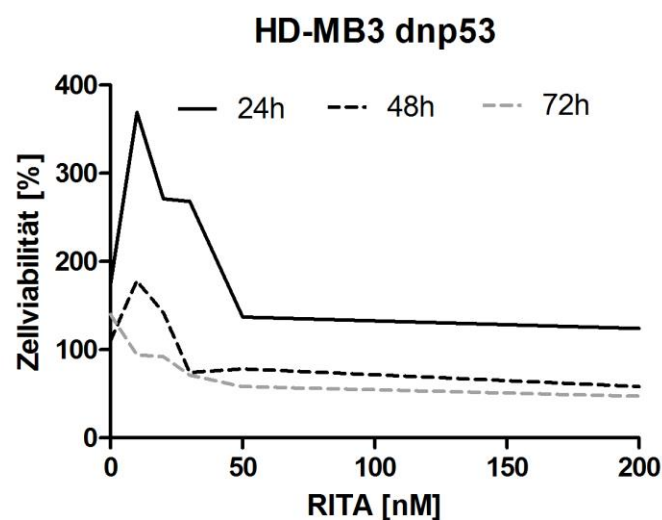


Abb. 16 Reduktion der Zellviabilität der HD-MB3-dnp53 nach RITA Behandlung gemessen mittels MTT 24, 48 und 72 Std nach Behandlung mit 0-200 nM RITA.

Die ermittelten IC₅₀s für die Zelllinien betragen 14,6 nM (\pm 5,5 nM) für die HD-MB3 dn p53 (vgl. IC₅₀ HD-MB3 = 19,4 nM \pm 6,4 nM) und für die ONS-76 dnp53 3,7 μ M (\pm 1,5 μ M) (vgl. IC₅₀ ONS-76 = 2,5 \pm 0,4 μ M). Es gab keinen signifikanten Unterschied (p-Wert= 0,07 für HD-MB3/HD-MB3 dnp53 und für die ONS-76/ONS-76 dnp53 p= 0,33) in der IC₅₀ zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zelllinien.

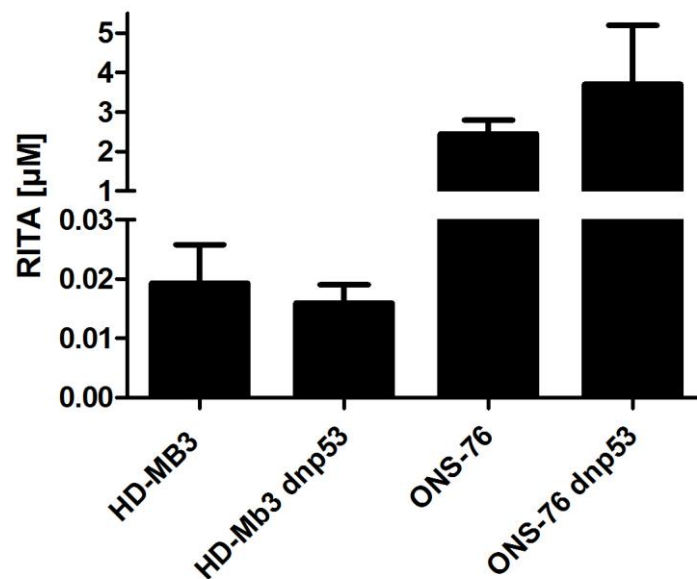


Abb. 17 IC 50- Daten der transfizierten HD-MB3-dnp53 im Vergleich zu den nicht transfizierten HD-MB3. Gemessen mittels MTT- Assay (n=3).

4.1.6.3 Auswirkung der RITA- Behandlung auf die Apoptoserate von Medulloblastomzelllinien mit dominant negativem p53

Nach Transfektion der HD-MB3 und ONS- 76 mit dem dn *p53*- Plasmid ändert sich die Apoptose- auslösende Wirkung von RITA auf diese Medulloblastomzellen nicht (Abb. 18). Die Apoptoserate der HD-MB3 kann nur nach 24 Std. RITA- Behandlung verglichen werden, da die durch den Assay nach 48 und 72 Std. gemessenen Zellen nur tote Zellen sind. Nach 24 Std. RITA- Behandlung zeigen die HD-MB3 165,5% (\pm 8,0%) apoptotische Zellen, die transfizierten HD-MB-Zellen hingegen nur 133,4% (\pm 18,3) apoptotische Zellen. Damit die ausgelöste Apoptose bei den HD-MB3 signifikant ($p < 0,0001$) höher, als bei den transfizierten HD-MB3 dn p53.

Bei den ONS-76 liegt die Apoptoserate bei 159,9% (\pm 39,3%) (im Vergleich zu den mit Ethanol behandelten Zellen) und die der ONS-76 dn p53 liegt bei 114,7% (\pm 8,0%). Die ONS-76 haben damit nach 72 Std. RITA- Behandlung eine 1,4-fach höhere Apoptoserate, als die transfizierten ONS-76 dnp53.

Damit ist die ausgelöste Apoptose bei den ONS-76 signifikant ($p < 0,0001$) höher, als bei den transfizierten ONS-76 dnp53.

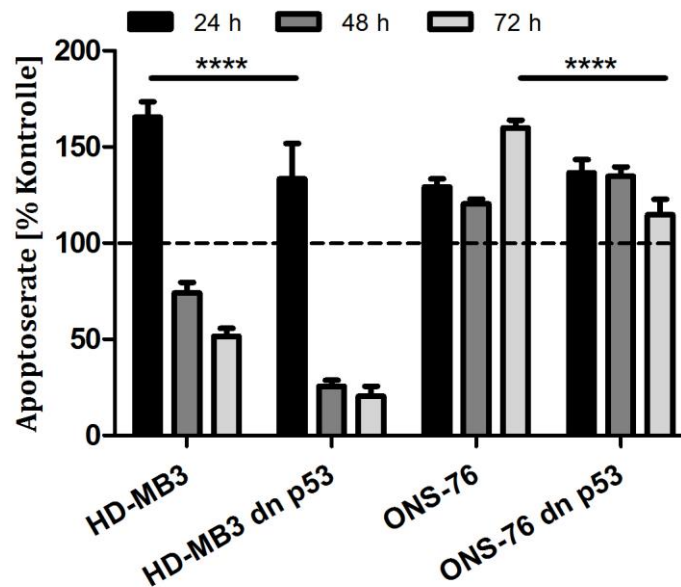


Abb. 18 Abnahme der Apoptoserate nach RITA- Behandlung bei dominant negativen p53 HD-MB3 und ONS-76 Zellen. Analyse ausgelöster Apoptose nach RITA-Behandlung zu drei Messpunkten (24, 48, 72 Std.) Balkendiagramm der Anzahl apoptotischer Zellen relativ zu den jeweils nur mit Ethanol behandelten Zellen derselben Zelllinie. Gemessen mittels Cell Death ELISA. Student's t- Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, $p < 0,0001$ ****.

4.1.6.4 Auswirkung der RITA- Behandlung auf die Zellproliferation transfizierter HD-MB3 und ONS-76

Der Vergleich der Proliferation bei den vier Zelllinien zeigte keine signifikanten Unterschiede nach RITA-Behandlung (Abb. 19). So zeigten die HD-MB3 dnp53 nach 72 Std. eine Proliferationsreduktion um 26,8% ($\pm 5,4\%$) im Vergleich zu den HD-MB3, die eine Reduktion der Proliferation von 22,5% ($\pm 2,5\%$) erfahren. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,69$).

Die ONS-76 dnp53 zeigten nach 72 Std. RITA- Behandlung keinen Proliferationsrückgang ($0,1\% \pm 0,8\%$), wohingegen die nicht transfizierten ONS-76 einen Proliferationsrückgang von 21,6% ($\pm 21,6\%$) hatten. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,2$).

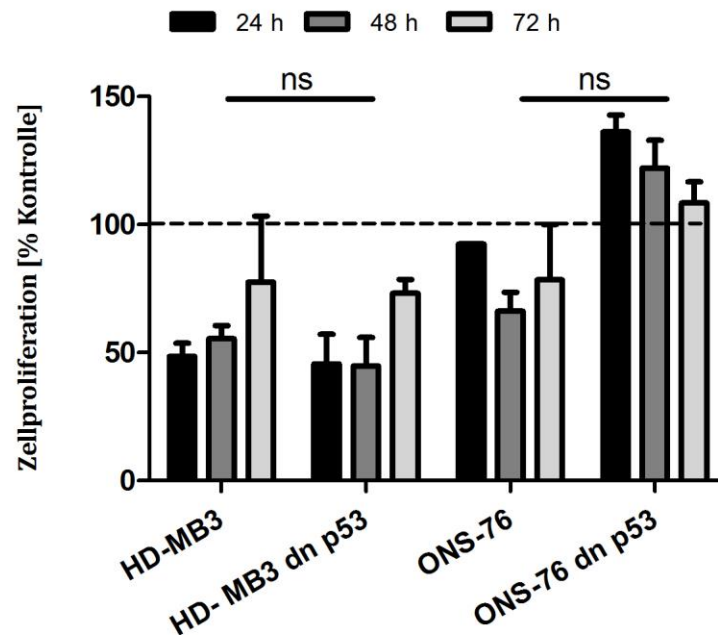


Abb. 19 Keine Änderung der Proliferation nach RITA-Behandlung bei HD-MB3 und ONS-76 Zellen mit dominant negativem p53. Analyse der Zellproliferation nach RITA-Behandlung zu drei Messpunkten (24, 48, 72 Std.) Balkendiagramm der Anzahl proliferierender Zellen relativ zu den jeweils nur mit Ethanol behandelten Zellen. Gemessen mittels ELISA-basierter BrdU Inkorporation. ns= nicht signifikant.

4.2 Die Wirkung von RITA auf die Expression bekannter p53-Zielproteine

Mittels Western Blot sollte untersucht werden, inwiefern sich eine RITA-Behandlung bei Medulloblastomzellen auf die Expression von p53 selbst und dessen bekannte Zielgene auswirkt. Untersucht wurden dabei folgende Proteine: p53, p21 und MDM-2.

p53 wurde untersucht, um zu überprüfen, ob RITA in der Lage ist, dieses Protein zu aktivieren und/oder zu einem Anstieg des p53- Proteingehaltes zu sorgen. Die Expression von p21 ist streng durch p53 reguliert und für den p53-statusabhängigen Zellzyklusarrest in der G1- Phase verantwortlich, als Reaktion auf unterschiedlichste Stressstimuli. Es ist ein Downstream- Protein des p53-Signalwegs, welches durch p53 transkriptionell induziert und damit aktiviert wird (Rodriguez and Meuth 2006). MDM-2 ist ein Protein, welches den Abbau von p53

initiiert und gleichermaßen über einen negativen Feedback- Mechanismus von p53 aktiviert wird.

Bei den DAOY, den HD-MB3 und den ONS-76 sieht man eine stärkere Expression von p53 und p21 nach RITA- Behandlung. Bei den DAOY und den ONS-76 konnte zusätzlich ein Ansteigen der Expression von MDM-2 nach RITA- Behandlung gezeigt werden. Weder bei den HD-MB3 noch bei den D-341 war es möglich MDM-2, trotz Verwendung verschiedenster Antikörper, zu detektieren. Die UW-228 zeigten keine Veränderung in der Proteinexpression von MDM-2 oder p53. Das p21 stellt sich nach RITA- Behandlung weniger stark da. D-341 Zellen zeigten keine Veränderung der Proteinmuster nach RITA- Behandlung. Hier werden die Werte für 48 Std. nach RITA- Behandlung gezeigt (Abb. 20).

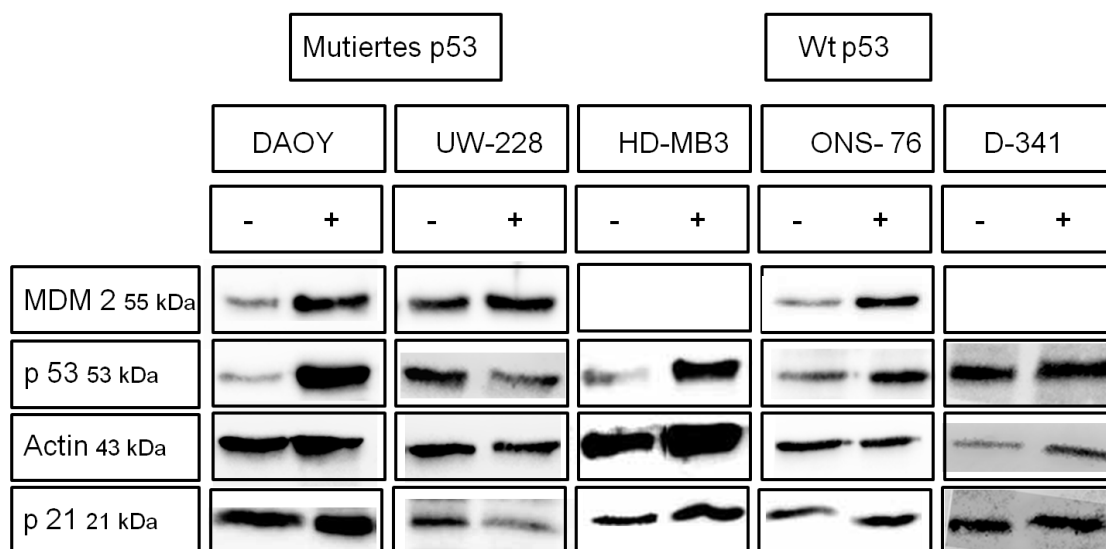


Abb.20 Modulation der Expression von p21, p53 und MDM-2 in Medulloblastomzellen nach RITA- Behandlung. Western Blot Analyse der Proteine p21, p53 und MDM-2 im Vergleich der Zellen mit RITA- bzw. EtOH- Gabe. Als Ladungskontrolle fungiert Aktin. Die Daten wurden durch den Vergleich mit der Expression von β -Aktin normalisiert.

4.3 Die Wirkung von RITA auf die transkriptionelle Modulation von p53- Zielgenen

Nachdem auf Proteinebene gezeigt werden konnte, dass es zu einer gesteigerten Expression von p53, p21 und MDM-2 kommt, sollte der Effekt von RITA auf mRNA-Ebene für MDM-2 und p21 mittels quantitativer Real- Time- PCR untersucht werden.

RITA- Behandlung resultiert nach 48 Std. in allen Zelllinien außer den UW-228 in einer signifikanten Induktion der relativen p21- Expression im Vergleich zu den mit Ethanol-behandelten Zellen. Bei den DAOY war die mRNA- Expression 6,7-fach ($\pm 0,5$; $p < 0,0001$), bei den HD-MB3 3,0-fach ($\pm 0,28$; $p = 0,0003$), bei den ONS-76 7,2-fach ($\pm 1,5$; $p = 0,0019$) und bei den D-341 5,5-fach ($\pm 1,1$; $p = 0,0017$) erhöht (Abb. 21).

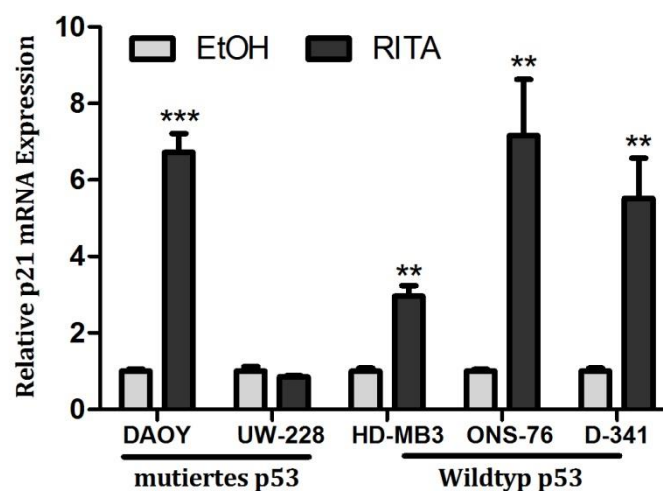


Abb. 21 mRNA- Expression von p21 nach RITA- Behandlung. Analyse der relativen p21- Expression nach 48- stündiger RITA- Behandlung. Balkendiagramm der Expression von p21 in RITA-behandelten Zellen relativ zu den jeweils nur mit Ethanol behandelten Zellen. Gemessen mittels qPCR. Student's t- Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Die MDM-2-Expression ist bei den mit RITA behandelten HD-MB3 1,7-fach ($p=0,0031$), den ONS-76 2,4-fach ($p=0,0137$) und den D-341 3,1-fach ($p<0,0001$) höher als in den mit Ethanol behandelten Zelllinien.

Die DAOY und die UW-228 zeigen keinen Anstieg der MDM-2- Expression. Im Gegenteil zeigen die DAOY eine signifikante Herabregulation der MDM-2-

Expression, die um das 0,58-fache ($p < 0,0001$) niedriger ist, als die Expression in den mit Ethanol behandelten Zellen (Abb. 22).

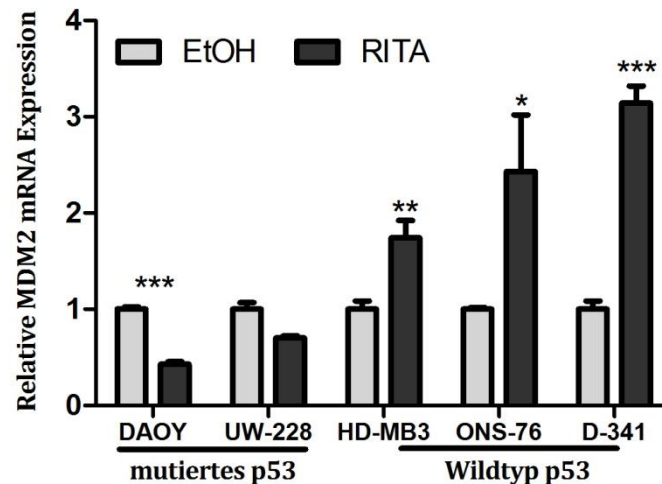


Abb. 22 mRNA- Expression von MDM-2 nach RITA- Behandlung. Analyse der relativen MDM-2- Expression nach 48- stündiger RITA- Behandlung. Balkendiagramm der Expression von MDM-2 in RITA-behandelten Zellen relativ zu den jeweils nur mit Ethanol behandelten Zellen. Gemessen mittels qPCR. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.4 Untersuchung der Effekte von RITA im Medulloblastom-Xenograftmodell

4.4.1 Beeinflussung des Tumorwachstums durch RITA- Behandlung

Als nächstes sollte untersucht werden, ob RITA eine antiproliferative und Apoptose- auslösende Wirkung auf Medulloblastomzellen *in vivo* besitzt. Dafür wurde die Medulloblastomzelllinie HD-MB3 s.c. in weibliche nu/nu-Mäuse gespritzt, nach neun Tagen mit der einmal täglichen i.p.- Behandlung mit RITA begonnen und die Entwicklung der Tumorgröße beobachtet. Die RITA-Gabe führte bereits nach sieben Behandlungstagen zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum führte (Tumervolumenwerte RITA- vs. DMSO- Gruppe, $p = 0,048$; Abb. 23). Auch nach neun Tagen Behandlung bleibt die Verlangsamung der Tumorgrößenentwicklung signifikant ($p = 0,045$).

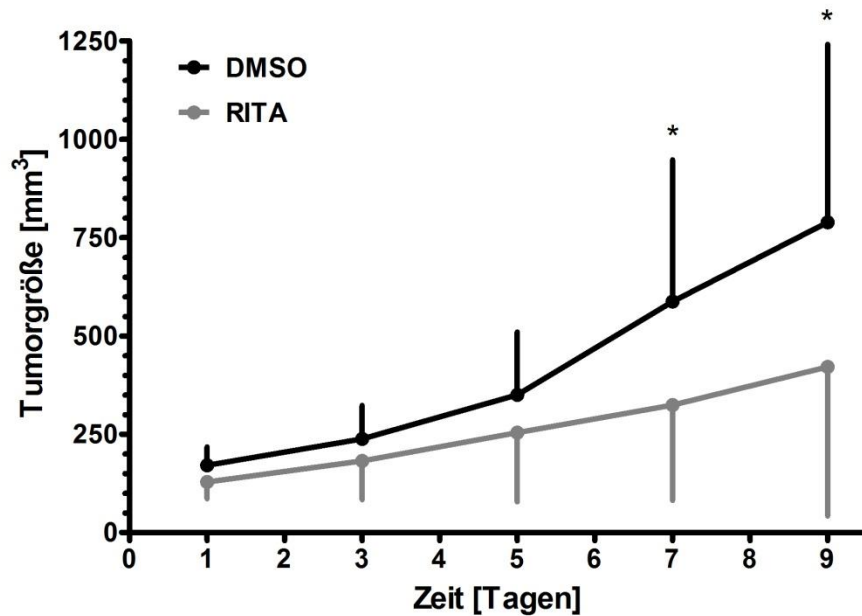


Abb. 23 Wachstum von Tumoren im nu/nu Mausmodell. Graphen des Tumolvolumens im Vergleich von RITA- behandelten Mäusen aus zwei Versuchen (mit RITA behandelte Mäuse; n = 13) im Vergleich zu nur mit DMSO- behandelten Mäusen (n = 10). Tumorentwicklung gemäß der s.c.- Injektion in der linken Flanke. Student's t-Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

In der Langzeitbetrachtung (Abb. 24) ergibt sich nach einer Beobachtungszeit von 30 Tagen zusätzlich ein signifikant verlängertes Überleben der Mäuse, die mit RITA statt mit DMSO behandelt wurden ($p = 0.04$).

Nach 30 Tagen mussten die noch überlebenden Mäuse aufgrund von Tumorprogress getötet werden.

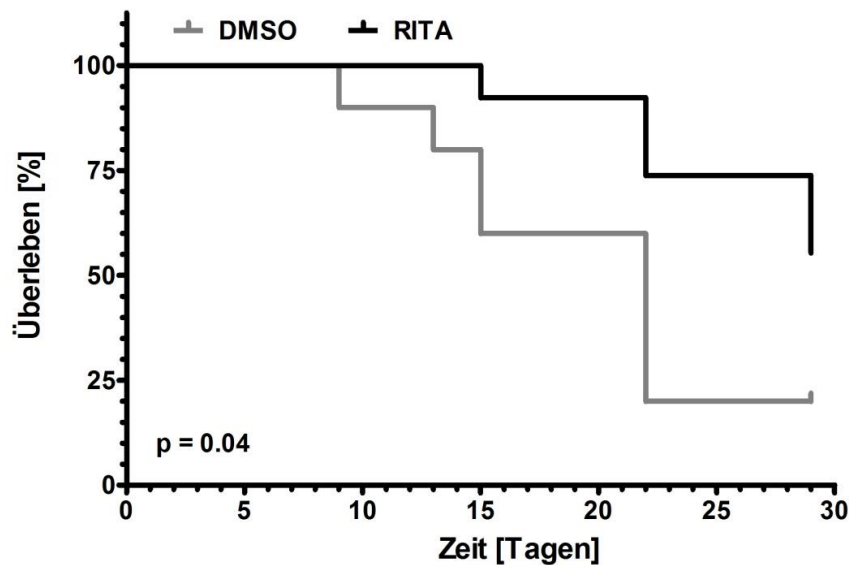


Abb. 24 Kaplan-Meier-Analyse des tumorfreien Überlebens von mit RITA-behandelten Mäusen (Behandlungskohorte; n = 13) im Vergleich zu nur mit DMSO behandelten Mäusen (n = 10). Tumorentwicklung gemäß der s.c. Injektion in der linken Flanke. Statistische Auswertung mit Log Rank Test.

4.4.2 Intensivbehandlung von nu/nu- Mäusen

Sechs weibliche nu/nu- Mäuse wurden 8 Tage nach Tumordinjektion ($1 \cdot 10^6$ HD-MB3- Zellen s.c.) für drei Tage zwei Mal täglich mit RITA (Endkonzentration 6mg/kg Maus/d) behandelt. Nach 72 Std. wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die entnommenen Tumoren wurden für immunohistologische Gewebeanfärbungen, qPCR und Western Blot aufbereitet.

4.4.2.1 Immunohistochemische Anfärbungen

Zunächst wurden die zu vergleichenden Tumoren in der HE- Färbung als Medulloblastome identifiziert (Abb. 25 obere Zeile). Die anderen Färbungen zeigen Protein Ki-67 als Proliferationsmarker, die Spaltung der Caspase 3 (Cl Caspase 3) als Apoptosemarker, sowie die Proteine MDM-2 und p53. Bereits im mikroskopisch fielen eine Mehrexpression von Ki-67, Cl Caspase 3 und von p53 auf. Die MDM-2- Expression in den mit RITA behandelten Zellen ist deutlich reduziert (Abb.25).

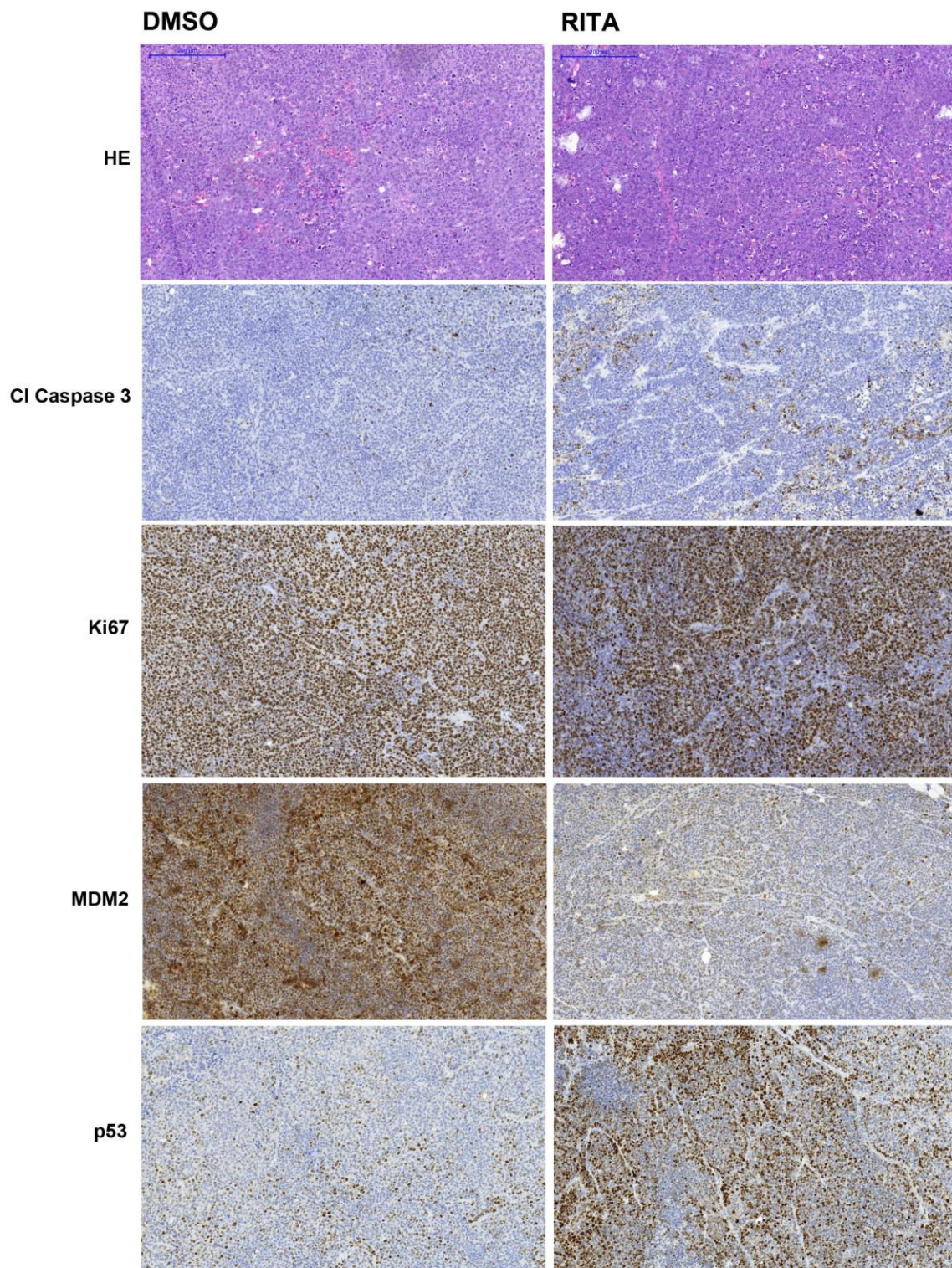


Abb. 25 Molekulare Charakteristika der *in vivo* Tumorzellen nach RITA- Behandlung
 Exemplarisch wurden die immunhistochemischen Färbungen je einer mit DMSO und einer mit RITA behandelten Maus gezeigt.
 HE- Färbung und immunhistochemische Färbungen einer Negativkontrolle (links, mit DMSO behandelt) und einer mit RITA- behandelten Maus (rechte Seite). Angefärbt wurden die Spaltung der Caspase 3, Ki-67, MDM-2 und p53. Maßstabsbalken 200µm.

Die folgenden Zahlenangaben ergeben sich aus jeweils fünf unterschiedlich ausgewählten Abschnitten eines jeden Tumors in der entsprechenden Färbung pro Gesichtsfeld.

Die Apoptose, gemessen durch die Spaltung der Caspase 3-Färbung steigt in mit RITA behandelten Mäusen signifikant an. Gezählt wurden positiv angefärbte Zellen. Für die mit RITA behandelten Mäuse ergab sich ein Durchschnittswert von 927,13 (\pm 470,5) der Spaltung der Caspase 3- positiver Zellen pro Feld im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Mäusen 124,9 (\pm 93,5). Alle Werte der Caspase 3- positiv gefärbten Zellen miteinander verglichen ergibt eine Signifikanz von $p = 0,003$. Die Ki-67 Färbung zeigte eine reduzierte Proliferation der mit RITA behandelten Mäuse, jedoch ist dieser Wert nicht signifikant (RITA: 2044,7 (\pm 575,0) versus DMSO 2706 (\pm 956,9)).

Wie bei den Untersuchungen *in vitro* wurde untersucht, ob RITA auch *in vivo* sowohl die Funktion von p53 reaktiviert und damit zu einer verstärkten Anfärbung führt und ob sich ebenso die MDM-2 Expression aufgrund des negativen Feedback-Mechanismus steigert. Für p53 konnte ein signifikanter Anstieg der p53-positiven Zellen in RITA-behandelten Tumoren gezeigt werden ($p < 0,0001$). Die mit RITA behandelten Mäuse zeigten durchschnittlich 2038,7 (\pm 115,0) positiv für p53 angefärbte Zellen, wohingegen die mit DMSO behandelten Mäuse nur 506,3 (\pm 12,9) p53-positiv- gefärbte Zellen zeigten.

Für MDM-2 zeigten die mit DMSO behandelten Mäuse durchschnittlich 3309,2 (\pm 466,4) positiv gefärbte Zellen. Im Vergleich dazu waren bei den mit RITA behandelten Mäusen signifikant weniger (613,8 (\pm 98,4), $p = 0,005$) positiv für MDM-2 gefärbte Zellen zu erkennen. Hiermit ergibt sich ein unterschiedliches Ergebnis, zu den *in vitro* gewonnen Daten.

Damit konnte also *in vivo* gezeigt werden, dass sich eine RITA Behandlung auf die Expression die Spaltung der Caspase 3, sowie p53- Expression im Sinne einer mehr- Expression auswirkt. Für die MDM-2- Expression trifft dies nicht zu. Hier zeigt sich eine deutliche geringer ausgeprägte Expression für MDM2. Die Ki- 67- Expression ist in der Tendenz geringer bei den mit RITA behandelten Mäusen, jedoch nicht signifikant.

Die anhand dieser Färbungen erhobenen Boxplot Daten zeigen, dass es zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0,003$) der Spaltung der Caspase 3 (cl-Caspase 3) kommt. Die ki-67 positiven Zellen zeigen lediglich eine Tendenz, dass die mit RITA behandelte Zellen weniger ki-67 positive Zellen exprimieren, die Daten sind jedoch nicht signifikant ($p = 0,123$) (Abb. 26).

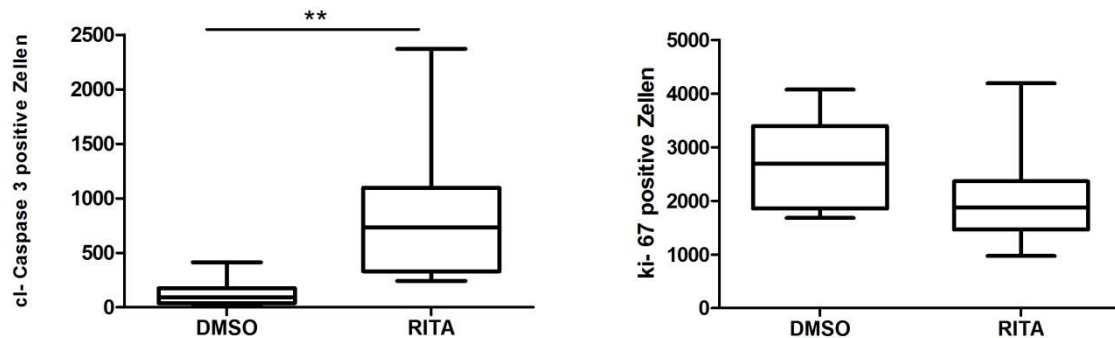


Abb. 26 Vergleich der Expression von Apoptose- und Proliferationsmarker in Xenografts von Medulloblastomzellen mit und ohne RITA- Behandlung. Boxplots fassen die Ergebnisse von DMSO-behandelten Mäusen ($n = 2$) im Vergleich zu den mit RITA ($n = 3$) behandelten Mäusen zusammen. Untersucht wurden die Spaltung der Caspase 3 und Ki-67. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Betrachtet man die Boxplot-Daten der immunhistochemischen Färbungen in Bezug auf die Zielgene von RITA, zeigt sich für p53 ($p = 0,0001$) ein signifikanter Anstieg der p53-Expression in den mit RITA behandelten Mäusen. Für die MDM2 – Expression ergibt sich eine signifikant geringere Expression bei den mit RITA behandelten Mäusen ($p = 0,0005$) (Abb. 27).

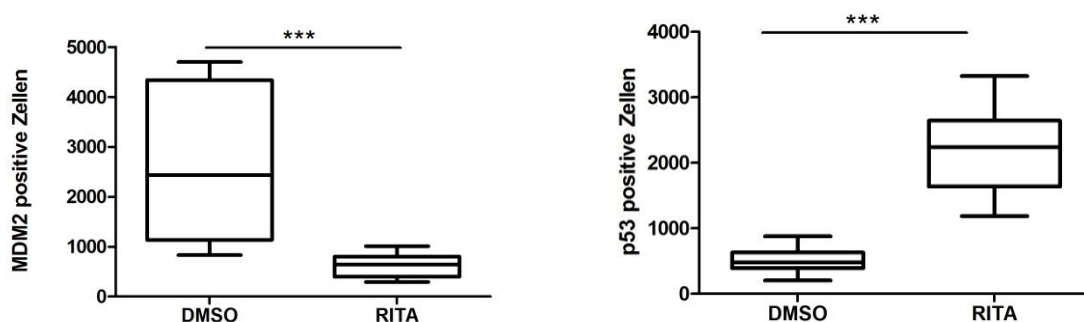


Abb. 27 Vergleich der Expression von p53-Zielgenen in Xenografts von Medulloblastomzellen mit und ohne RITA- Behandlung. Boxplots fassen die Ergebnisse von DMSO-behandelten Mäusen ($n = 2$) im Vergleich zu den mit RITA ($n = 3$) behandelten Mäusen zusammen. Untersucht wurden die MDM-2- und p53- Expression. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.4.2.2 Beeinflussung der mRNA Expression von MDM-2, p21 und p53 *in vivo*

Nachdem die Ergebnisse der qPCR *in vitro* einen signifikanten Effekt von RITA-Behandlung auf die MDM-2 und p21- mRNA bei HD-MB3 Zellen zeigten, wurde auch *in vivo* untersucht, inwiefern eine Behandlung von Tumorzellen mit RITA die Transkription der p53- Zielgene induziert. In diesem Fall wurden die mRNA-Expression von MDM-2, p21 und p53 untersucht.

Die MDM-2-mRNA-Expression war bei den mit RITA behandelten Mäusen 1,7-mal höher als bei den mit DMSO behandelten Mäusen. Der Anstieg der MDM-2-Expression war signifikant ($p = 0,01$).

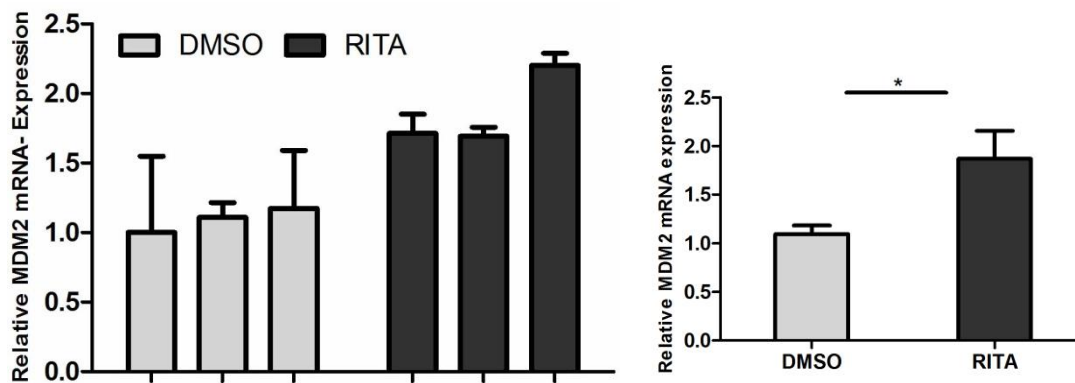


Abb. 28 Expression von MDM-2 nach RITA- Behandlung *in vivo*. Analyse der MDM-2 mRNA- Expression nach RITA- Intensivbehandlung nach 72 Std. Links: Balkendiagramm der Expression von MDM-2 in den einzelnen mit RITA-behandelten Tumoren *in vivo* relativ zu den jeweils nur mit DMSO- behandelten Tumoren. Rechts zeigt die aggregierten Daten. Gemessen mittels qPCR. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Bei der p21-Expression zeigt sich kein signifikanter Anstieg, jedoch eine Tendenz in den mit RITA behandelten Mäusen gegenüber den mit DMSO behandelten Mäusen (Abb. 28).

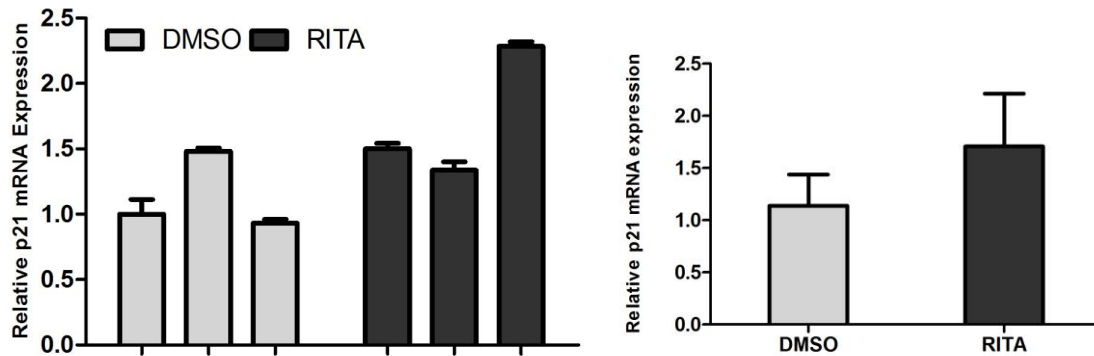


Abb. 29 Expression von p21 nach RITA- Behandlung *in vivo*. Analyse der p21 mRNA-Expression nach RITA- Intensivbehandlung nach 72 Std. Links: Balkendiagramm der Expression von p21 in RITA-behandelten Tumoren *in vivo* relativ zu den jeweils nur mit DMSO behandelten Tumoren. Rechts: Balkendiagramm der aggregierten Daten. Gemessen mittels qPCR. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Zusätzlich wurde *in vivo* auch die p53- Expression gemessen. Hierbei zeigte sich eine 1,7-mal höhere mRNA - p53- Expression der mit RITA behandelten Mäuse, im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Mäusen. Dieser Anstieg war signifikant ($p=0,03$).

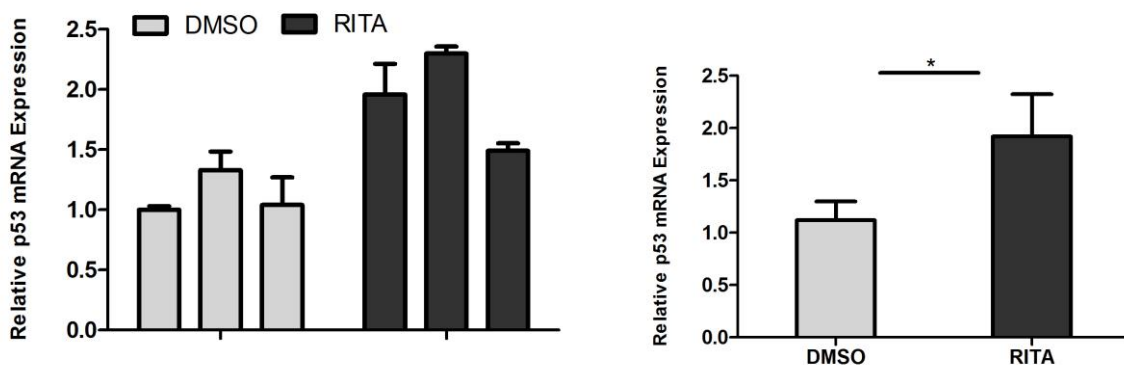


Abb. 30 Expression von p53 nach RITA- Behandlung *in vivo*. Analyse der p53 mRNA-Expression nach RITA- Intensivbehandlung nach 72 Std. Links Balkendiagramm der Expression von p53 in RITA-behandelten Tumoren *in vivo* relativ zu den jeweils nur mit DMSO behandelten Tumoren. Rechts Balkendiagramm der zusammengefassten Gruppen. Gemessen mittels qPCR. Student's t- Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

5. Diskussion

Das Medulloblastom gehört zu den bösartigsten Hirntumoren im Kleinkindes- und Kindesalter. Obwohl es bei einer kompletten Resektion eine 5- Jahres-Überlebenschance von 93% gibt, liegen die 5- Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten bei unvollständiger Tumorentfernung oder bei Vorliegen von Metastasen bei nur 56% bzw. 38% (Rutkowski, Bode et al. 2005). Einen großen Einfluss auf das Scheitern der Behandlung bei Medulloblastom-Tumoren hat die Resistenz gegenüber Chemotherapie, welche oftmals mit einer Störung der p53 Signalkette einhergeht. Da es in Medulloblastomen selten zu Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 kommt, muss es andere Ursachen für die Fehlfunktion von p53 geben. Daher liegt ein Schwerpunkt der Forschung vor allem darin, Mechanismen zu finden, welche die Funktion von p53 unterbinden. In diesem Zusammenhang spielt MDM-2, das den Abbau von p53 reguliert, eine zentrale Rolle. Von daher wurde die Entwicklung von Substanzen forciert, die in der Lage sind, die Funktion von p53 wieder herzustellen. Erst kürzlich konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die p53- Reaktivierung auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden kann (Ryan, Phillips et al. 2001; Benard, Douc-Rasy et al. 2003; Wang and El-Deiry 2008; Shangary and Wang 2009; Joerger and Fersht 2010; Selivanova 2010; Lane, Brown et al. 2011; Essmann and Schulze-Osthoff 2012; Stegh 2012). Zu diesen zählen z.B. die Induktion einer verstärkten p53-Expression, das Absterben von Zellen mit nicht-funktionsfähigem p53 und eine Verstärkung der Bindung von p53 an DNA, um die p53-gestützte Transkription voranzutreiben. Vor allem die Aktivierung des p53 durch kleine Moleküle, wie z.B. PRIMA-1, MIRA-1 und STIMA-1 scheint eine bedeutende Rolle zu spielen (Saha, Qiu et al. 2013).

Der Ansatz, die Bindung bzw. Interaktion zwischen MDM-2 und p53 zu unterbrechen, z.B. durch JNJ-26854165 (diese Substanz befindet sich bereits in Phase 1- Studien (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010)), Nutlin und RITA, ist ein interessanter Aspekt in der experimentellen Tumorthherapie. Die Substanz Nutlin wurde bereits in Medulloblastomzelllinien untersucht und zeigte da einen

„klassischen“ p53-abhängigen Effekt (Kunkele, De Preter et al. 2012). Ein Aspekt, den RITA für weitere Studien interessant macht, ist der, dass auch bei Tumoren, die bereits viele Kreuzresistenzen gegenüber anderen Chemotherapeutika im Laufe der Therapie entwickelten, die Sensitivität gegenüber einer Therapie mit RITA erhalten blieb (Jones, Bjorklund et al. 2012). Somit lohnen sich an dieser Stelle die Bemühungen, noch besser zu verstehen, wie genau RITA wirkt und inwiefern man sich dessen Wirkung in der Tumorthherapie effektiv zu Nutze machen kann.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von RITA auf Medulloblastomzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht. In einigen anderen *in vitro* Studien konnten bisher die synergistischen Effekte RITAs mit anderen Molekülen beobachtet werden, welche die p53 Funktion wiederherstellen sollen (Di Marzo, Forte et al. 2014).

Eine Untersuchung der Wirkung von RITA in Kombination mit anderen Chemotherapeutika im Medulloblastom wurden in dieser Arbeit nicht vorgenommen.

5.1 RITA hemmt die Proliferation von Medulloblastom- Zellen *in vitro*

Das kleine Molekül RITA bindet an die MDM-2- Bindungsstelle des p53 und blockiert somit die Suppression der p53-Funktion durch MDM-2. Nach der Entdeckung wurde seine Wirksamkeit zunächst in Kolonkarzinom-, Osteo- und Fibrosarkomzellen untersucht und zeigte hierbei eine antitumorale Funktion (Issaeva, Bozko et al. 2004). In weiteren Veröffentlichungen konnte derselbe Effekt in Burkitt-Lymphomzellen und im Multiplen Myelom gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RITA gegen Medulloblastomzelllinien *in vitro* aktiv ist und die Funktion von p53 wiederherstellt. So führte eine Behandlung mit RITA zu einer Reduktion der Zellviabilität, einer signifikanten Erhöhung der sub G1- Phase (vor allem in den HD-MB3- Zellen), einem signifikanten S- Arrest (DAOY, ONS-76) oder zu einem G2- Arrests (ONS-76). Auch Surget et al. (Surget, Descamps et al. 2014) zeigten diesen Effekt in Myelomzellen, wohingegen ein

relevanter Effekt auf die S- Phase ausblieb. Außerdem war RITA in der Lage, p53-Kaskaden zu aktivieren. Betrachtet man die qPCR- Daten, erhöht sich in allen Zelllinien, unabhängig der Apoptose auslösenden Funktion von RITA, die p21-mRNA- Expression. Interessanterweise ist die MDM-2- mRNA- Expression nur bei den Wildtyp-Zelllinien HD-MB3, ONS-76 und den D-341 nach RITA- Behandlung gesteigert und nicht bei den Medulloblastom- Zelllinien mit mutiertem *p53*, DAOY und UW-228.

RITA zeigt eine antiproliferative, Apoptose- auslösende und Zellzyklushemmende Wirkung auf Medulloblastomzellen *in vitro*. Zudem werden p53 und seine Folgeproteine durch eine RITA-Behandlung stärker exprimiert.

Vergleicht man nun *in vitro* die mRNA- mit den Western Blot-Daten, fallen geringfügige Unterschiede auf: obwohl alle Zelllinien (bis auf die UW-228) einen signifikanten Anstieg der p21-mRNA- Expression und alle Wildtyp-Zelllinien (HD-MB3, ONS-76 und D-341) einen signifikanten MDM2-mRNA- Anstieg zeigen, lässt sich dies nicht eindeutig auf Proteinebene darstellen. Die UW-228 zeigen z.B. eine deutlich weniger starke Expression des p21 Proteins im Western Blot. Die D-341 zeigen keinen Anstieg der Mehrexpression des p21 Proteins. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass RITA nach 48 Std. Behandlung bereits die Transkription/ Translation des p21 aktiviert hat, dies sich jedoch noch nicht auf Proteinebene äußert. In Bezug auf die MDM2-Expression zeigen die DAOY im Western Blot einen deutlichen Anstieg der Proteinexpression, dies steht im Widerspruch zu den hierzu erhobenen Real Time-PCR Daten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der MDM2-Proteinabbau verzögert stattfindet oder das Protein an sich stabiler ist. Auch möglich ist, dass RITA zusätzlich einen gezielten Effekt auf das MDM2-Protein an sich und nicht nur auf dessen Transkription bzw. Translation hat.

Unklar ist nach wie vor, wie genau RITA wirkt, ob es nun wirklich an dem N-terminalen Ende des p53 bindet oder ob es zu Konformationsänderungen des p53 führt und welche anderen Proteine es außerhalb der p53- Kaskade aktiviert, wie z.B. den JNK/SAPK- Signalweg. Außerdem hat man nach wie vor nicht verstanden, warum Zelllinien so unterschiedlich auf eine RITA- Behandlung reagieren. Eine

Idee ist, dass die Aufnahme, Verstoffwechselung und der Abbau RITA innerhalb der Zelle unterschiedlich sein wird, jedoch sind auch hierfür die Mechanismen bisher nicht geklärt. Wenn man dies besser verstanden haben wird, wird es umso leichter sein, RITA sinnvoll in der anti-tumoralen Therapie zu verwenden.

5.2 RITA wirkt unabhängig vom *p53*- Status

Nachdem frühere Untersuchungen des niedermolekularen Moleküls RITA einen *p53*- abhängigen Status bezüglich der Wirkung zeigten, waren wir überrascht zu sehen, dass bereits unsere ersten Experimente, die durchgeführten Viabilitätsassays, erste Anhaltspunkte dafür lieferten, dass RITA im Medulloblastom unabhängig vom *p53*- Status wirkt. Es gibt andere Publikationen, die ebenfalls eine Wirkung RITAs sowohl in Zelllinien mit wt *p53* als auch in Zelllinien mit mutiertem *p53* nachweisen. Viele von Ihnen deuten aber daraufhin, dass vor allem die Zelllinien mit einem Wt *p53* wesentlich sensibler auf RITA reagieren, als die Zelllinien mit mutiertem *p53* (Kazemi, Safa et al. 2011; Jones, Bjorklund et al. 2012). Wenn man die IC50s in dieser Arbeit im Vergleich betrachtet, fällt auf, dass sowohl die DAOY, die ein mutiertes *p53* haben und die HD-MB3, mit einer SNP- Änderung, aber ansonsten nicht mutiertem *p53*- Gen, sehr sensibel im nM- Bereich auf die RITA- Behandlung reagieren. Dahingegen zeigen die ONS-76 (ebenfalls SNP-Veränderung) ein mittleres Ansprechen auf RITA- Behandlung, während die UW-228 (mutiertes *p53*) und D-341 (normales *p53*) keine Beeinflussung ihrer Viabilität aufgrund der RITA-Behandlung aufweisen. Bereits Zhao et al. (Zhao, Grinkevich et al. 2010) zeigten eine Reaktivierung von mutiertem *p53* im kolorektalen Karzinom, epidermoiden Karzinomen und Burkitt-Lymphom X.

Um einen weiteren Beweis dafür zu liefern, dass der *p53*- Status keinen Einfluss auf RITAs Wirkung im Medulloblastom hat, wurden HD-MB3 und ONS-76 Zellen mit einem dominant negativen *p53*- Vektor transfiziert und damit de facto *p53* ausgeschaltet. Die PCR- Kontrolle bestätigte die Anwesenheit des Vektors, wodurch man von der funktionellen Inaktivierung des *p53* ausgeht. Trotz dieses

Schrittes änderten sich die ermittelten IC50s nicht. Auch Weilbacher et al. (Weilbacher, Gutekunst et al. 2014) zeigten Daten von Ovarialkarzinomzellen, in denen p53 mit einer siRNA ausgeschaltet und die mit RITA behandelt wurden. In dieser Studie konnte ebenfalls kein Unterschied bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber einer RITA- Behandlung zwischen den transfizierten und nicht transfizierten Zelllinien festgestellt werden.

Anschließend betrachteten wir erneut die antiproliferative und apoptose-auslösende Wirkung von RITA. Die ausgelöste Apoptose war überraschenderweise trotzdem signifikant unterschiedlich in den Zelllinien, bei denen wir das p53 inaktiviert hatten, im Vergleich zu denen mit einer normalen p53- Funktion. Die nicht- transfizierte Zelllinie war jeweils noch empfindlicher gegenüber eine Behandlung mit RITA, nichtsdestotrotz war die Wirkung RITAs auf die transfizierten Zelllinien sehr deutlich. Auch Zhao et al. (Zhao, Grinkevich et al. 2010) untersuchten die Wirkung RITAs auf unterschiedliche Tumoren mit p53- Mutation, wie z.B. Kolon- und Brustkrebszellarten. Seine Forschungsgruppe konnte eine Wirkung RITAs zeigen, die unterhalb der gegenüber Wt- Zelllinien liegt (Issaeva, Bozko et al. 2004), die trotzdem (abhängig der Zelllinie) bis nach max. 7 Tagen zum Tode der Tumorzellen führt. Die Proliferationshemmung nach RITA- Behandlung verlief nahezu identisch. Auch Surget et al. (Surget, Descamps et al. 2014) untersuchte und bestätigte diese Beobachtung in Myelomzellen. Diese Beobachtungen geben einen Hinweis darauf, dass RITA evt. verstärkt Einfluss auf den apoptotischen Signalweg des p53 hat, als auf andere Funktionen/Zielproteine des p53.

Seitdem Krajewski et al. (Krajewski, Ozdowy et al. 2005) in einer Nuklear-Magnet-Resonanz (NMR) Studie eine theoretische Berechnung veröffentlichten, dass RITA nicht die MDM-2 Bindungsstelle am p53 blockiert, wird das Thema stark diskutiert, wie genau RITA wirkt und ob es die Bindungsstelle des MDM-2 tatsächlich blockiert. Definitive Ergebnisse hierzu stehend bisher aus. Es ist auch gut möglich, dass die RITA-abhängige Aktivierung des p53- Signalweges unabhängig von der Bindung von MDM-2 und p53 wirkt. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass auch im Rahmen dieser Arbeit die Ergebnisse der Wirkungen auf das MDM-2 *in vitro*

und *in vivo* (und selbst innerhalb der *in vivo*- Ergebnisse) so unterschiedlich sind. So wurde mittlerweile z.B. auch der JNK- Weg als apoptotische Kaskade unter RITA Behandlung untersucht und erste Daten im Multiplen Myelom zeigen auch hierbei einen Apoptose auslösenden Effekt (Saha, Jiang et al. 2012). Auch ein Auslösen des Zelltodes über den p38 – Signalweg konnte mittlerweile untersucht werden. So gibt es erste Daten, die zeigen, dass ein Ausschalten der p38 Funktion bei anschließender RITA- Gabe zu weniger Apoptose führt, als bei funktionierendem *p38* (Weilbacher, Gutekunst et al. 2014).

Diese Ergebnisse zeigen also, dass RITA unabhängig vom *p53*- Status wirkt und trotzdem Apoptose auslöst. D.h. dass es nicht nur über *p53*, sondern auch über andere Wege seine antitumorale Wirkung entfaltet, die es noch genauer zu untersuchen gilt.

5.3 RITA reduziert signifikant das Tumorwachstum von Medulloblastom- Xenografts

Im Anschluss an die Untersuchung der Wirksamkeit von RITA in Medulloblastomzellen *in vitro* sollte untersucht werden, ob RITA *in vivo* in Medulloblastomzellen wirkt. Die erhobenen Daten dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Effekt einer RITA Behandlung auf sowohl die Wachstumshemmung der Tumoren, als auch für das Überleben der mit RITA- im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten Mäuse. Die Wirkung von RITA in anderen Tumorentitäten *in vivo* konnte bereits gezeigt werden so z.B. von Issaeva et al. (Issaeva, Bozko et al. 2004) und Grinkevich et al. (Grinkevich, Nikulenkov et al. 2009). Sie untersuchten dabei eher den dosisabhängigen Effekt einer RITA-Behandlung auf Kolonkarzinomzellen mit und ohne funktionsfähigem *p53*. Sie konnten zeigen, dass die Gabe einer höheren RITA-Dosis linear zum verlängerten Überleben verlief.

Eine weitere Studie verglich den Effekt der RITA- Behandlung gegen DMSO im Neuroblastom (Burmakin, Shi et al. 2013) und konnte nach 18 Tagen i.p.- Behandlung einen Trend zeigen, dass mit RITA behandelte Mäuse ein geringeres Tumorwachstum hatten, als die mit DMSO behandelten Mäuse. Diese Studie belegte auch, dass es zu keinen relevanten Nebenwirkungen, wie z.B. Fellpflege, durch eine Behandlung mit RITA kommt. Auch scheinen nichtmaligne Zellen wesentlich weniger sensibel auf RITA zu reagieren, teilweise sogar gar nicht (Saha, Jiang et al. 2010; Weilbacher, Gutekunst et al. 2014), was einen Vorteil für die Tumorthherapie in der Klinik darstellen kann. Die Intensivbehandlung (2x tgl.) mit RITA zeigt einen signifikanten Anstieg der cleaved Caspase 3, welches zeigt, dass Apoptose in den Tumorzellen ausgelöst wird. Surget et al. konnte ebenso zeigen, dass RITA über die Caspase 3- und 9- Aktivierung Apoptose in Myelomzellen auslöst (Surget, Descamps et al. 2014). Wie auch *in vitro* steigen die Expressionen von MDM-2 (signifikant) und p21 (Tendenz) an, ein Hinweis darauf, dass die Funktion von p53 durch RITA auch *in vivo* wiederhergestellt wird.

Die hierbei auffallende Diskrepanz der *in vitro* HD-MB3-Daten zu den *in vivo* Daten lässt sich leider nicht komplett erklären. Da die genaue Kinetik von RITA nicht bekannt ist, könnte eine mögliche Erklärungen z.B. ein „ungünstig“ gewählter Zeitpunkt für die RITA-Gaben *in vivo* sein. So ist es denkbar, dass RITA früher oder später, als zu dem gemessenen Zeitpunkt, einen Einfluss auf MDM2 hat. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es vielleicht andere, sekundäre Feedback-Schleifen gibt, die *in vivo* für eine Runterregulation des MDM2 Proteins sorgen, die *in vitro* nicht existieren. Des Weiteren könnte der MDM2-spezifische Effekt von RITA *in vivo* konzentrationsabhängig sein. Außerdem sollte man Bedenken, dass die Antikörper, die für Western Blot, qPCR und Immunhistochemie verwendet worden sind, unterschiedlichen klonalen Ursprungs waren. Besonders in der Immunhistochemie ist die Proteinexpression teilweise schwer zu interpretieren und zu quantifizieren. In Bezug auf die mRNA-Daten konnte für MDM2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*

erhöhte mRNA Level nach RITA-Behandlung gezeigt werden.

Es wird deutlich, dass RITA auch *in vivo* eine antitumorale Wirkung hat und dabei keine Nebenwirkungen wie z.B. Änderung der Fellpflege oder Nahrungsaufnahme auftrat. Daher sollte RITA für klinische Studien in Betracht gezogen werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RITA (*Restoration of p53 and Induction of Tumor Apoptosis*) eine Wirkung gegen humane Medulloblastomzelllinien hat. Der Signalweg ist bisher nicht sicher geklärt und verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RITA eine antiproliferative und apoptoseauslösende Wirkung auf Medulloblastomzellen *in vitro* und *in vivo* unabhängig des p53-Status hat. In den *in vitro*- Versuchen wurde ein Anstieg von den Proteinen p21, p53 und MDM2 nach RITA Behandlung gezeigt. Zusätzlich konnte ein Zellzyklusarrest bestätigt werden. Es sollte aber weiterhin im Rahmen von (auch klinischen) Studien untersucht werden, ob sich RITA eignet, Patienten mit Medulloblastomen zu behandeln, die keine *p53*-Mutation aufweisen, und evt. sogar auch Patienten, deren Medulloblastome ein mutiertes *p53* haben.

In einigen anderen *in vitro* Studien konnten bisher die synergistischen Effekte RITAs mit anderen Molekülen untersucht werden, welche die p53 Funktion wiederherstellen sollen. Daher scheint es sinnvoll diese Kombinationsstudien auch für das Medulloblastom durchzuführen.

Die *in vivo*- Versuche zeigten eine signifikante Tumorstillstand durch die RITA- Behandlung im Vergleich zur Kontrollkohorte. Da RITA in bisherigen *in vivo* Studien keine toxischen Effekte zeigt und zusätzlich die bisher damit untersuchten/behandelten Tumoren keine Resistenzentwicklung zeigen, lohnt es, sich die Funktionsweise weiterhin genauer zu untersuchen und sich RITA zu Nutze zu machen. Hiermit eröffnen sich neue, vielversprechende Möglichkeiten für therapeutische Anwendungen in der Klinik.

7. Abstract

Background: Medulloblastoma accounts for about 20 % of the brain tumors in children. With an overall survival of 40-70% despite multimodal therapy approaches (surgery, radiation and chemotherapy), medulloblastoma still represents a major clinical challenge in pediatric oncology. Since dysfunction of p53, because of mutations in the *TP53* tumor suppressor gene, is rare in neuroectodermal embryonal tumors, including medulloblastomas, other mechanisms inactivating p53 have to be identified. One of the mechanisms is an overexpression of MDM-2. Based on the existing data, functional reactivation of p53 and/or inhibition of the p53/MDM-2 axis in medulloblastoma is widely considered to be a promising therapeutic option for this most common brain tumor in children. RITA (**R**estoration of p53 and **I**nduction of **t**umour **a**poptosis) has been identified to be able to disrupt the MDM-2/p53 axis, as well as it has been proven to induce apoptosis very effectively so far in colon carcinomas and neuroblastomas for example. This project aims at identifying the therapeutic potential to interrupt the MDM-2/p53 axis in medulloblastoma with the small-molecule RITA.

Results: Through treatment of medulloblastoma cell lines with RITA the expression of MDM-2, p53 and p21 increased *in vitro*. Treatment of the cells with RITA reduced cell viability, although this was done independent of the p53 status. Another effect of the RITA treatment was a cell cycle arrest in the S- phase. Even the transfection of medulloblastoma cell lines with a dominant negative p53 did not change RITA's effect on the cells, in that matter that it still induced apoptosis. We could also show an effect of RITA against the medulloblastoma *in vivo*. RITA was able to significantly reduce the tumor growth in mice treated with RITA as well as it enabled a significantly longer overall survival for the mice.

Concluding, RITA seems to be a promising substance in the line of small molecules to treat medulloblastoma *in vitro and in vivo*. But further understanding on how it works exactly is necessary in order to be able to use it as a therapeutic approach in medulloblastoma patients.

8. Literaturverzeichnis

1. (2012). "HIT- REZ 2005, Version 7 ".
2. Adesina, A. M., J. Nalbantoglu and W. K. Cavenee (1994). "p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma." Cancer Res 54(21): 5649-5651.
3. Allen, P. T., G. V. Archangelskaya, S. T. Belyaev, V. F. Demin, B. M. Drottz-Sjoberg, P. Hedemann-Jenson, M. Morrey, V. A. Prilipko, P. V. Ramsaev, G. M. Rumyantseva, M. N. Savkin, C. Sharp and A. M. Skryabin (1996). "Optimization of health protection of the public following a major nuclear accident: interaction between radiation protection and social and psychological factors." Health Phys 71(5): 763-765.
4. Artandi, S. E. and L. D. Attardi (2005). "Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer." Biochem Biophys Res Commun 331(3): 881-890.
5. Batra, S. K., R. E. McLendon, J. S. Koo, S. Castelino-Prabhu, H. E. Fuchs, J. P. Krischer, H. S. Friedman, D. D. Bigner and S. H. Bigner (1995). "Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas." J Neurooncol 24(1): 39-45.
6. Benard, J., S. Douc-Rasy and J. C. Ahomadegbe (2003). "TP53 family members and human cancers." Hum Mutat 21(3): 182-191.
7. Biegel, J. A. (1999). "Cytogenetics and molecular genetics of childhood brain tumors." Neuro Oncol 1(2): 139-151.
8. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
9. Burmakin, M., Y. Shi, E. Hedstrom, P. Kogner and G. Selivanova (2013). "Dual targeting of wild-type and mutant p53 by small molecule RITA results in the inhibition of N-Myc and key survival oncogenes and kills neuroblastoma cells in vivo and in vitro." Clin Cancer Res 19(18): 5092-5103.

10. Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.
11. Cadwell, C. and G. P. Zambetti (2001). "The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth." Gene 277(1-2): 15-30.
12. Chang, C. (1969). "Stadieneinteilung der Medulloblastome."
13. Chen, J., V. Marechal and A. J. Levine (1993). "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains." Mol Cell Biol 13(7): 4107-4114.
14. Di Cintio, A., E. Di Gennaro and A. Budillon (2010). "Restoring p53 function in cancer: novel therapeutic approaches for applying the brakes to tumorigenesis." Recent Pat Anticancer Drug Discov 5(1): 1-13.
15. Di Marzo, D., I. M. Forte, P. Indovina, E. Di Gennaro, V. Rizzo, F. Giorgi, E. Mattioli, C. A. Iannuzzi, A. Budillon, A. Giordano and F. Pentimalli (2014). "Pharmacological targeting of p53 through RITA is an effective antitumoral strategy for malignant pleural mesothelioma." Cell Cycle 13(4): 652-665.
16. Ellison, D. (2002). "Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics." Neuropathol Appl Neurobiol 28(4): 257-282.
17. Enge, M., W. Bao, E. Hedstrom, S. P. Jackson, A. Moumen and G. Selivanova (2009). "MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53." Cancer Cell 15(3): 171-183.
18. Espinoza-Fonseca, L. M. (2005). "Targeting MDM2 by the small molecule RITA: towards the development of new multi-target drugs against cancer." Theor Biol Med Model 2: 38.
19. Essmann, F. and K. Schulze-Osthoff (2012). "Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy." Br J Pharmacol 165(2): 328-344.

20. Fridman, A. L. and M. A. Tainsky (2008). "Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling." Oncogene 27(46): 5975-5987.
21. Gardner, H., G. Gaedicke, C. Niemyer and J. Ritter, Eds. (2006). Spezielle Pädiatrische Onkologie: Solide Tumoren, Springer Berlin
22. Giordana, M. T., D. Duo, S. Gasverde, E. Trevisan, A. Boghi, I. Morra, L. Pradotto, A. Mauro and A. Chio (2002). "MDM2 overexpression is associated with short survival in adults with medulloblastoma." Neuro Oncol 4(2): 115-122.
23. Grinkevich, V. V., F. Nikulenkov, Y. Shi, M. Enge, W. Bao, A. Maljukova, A. Gluch, A. Kel, O. Sangfelt and G. Selivanova (2009). "Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis." Cancer Cell 15(5): 441-453.
24. Guo, X. and A. A. Mills (2007). "p63, cellular senescence and tumor development." Cell Cycle 6(3): 305-311.
25. Hämatologie, G. f. P. O. u. (2012). "Leitlinie zum Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter."
26. Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene 24(17): 2899-2908.
27. Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz and M. Oren (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature 387(6630): 296-299.
28. Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." Mol Cell 1(1): 3-11.
29. Issaeva, N., P. Bozko, M. Enge, M. Protopopova, L. G. Verhoef, M. Masucci, A. Pramanik and G. Selivanova (2004). "Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors." Nat Med 10(12): 1321-1328.
30. Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2010). "The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(6): a000919.

31. Jones, R. J., C. C. Bjorklund, V. Baladandayuthapani, D. J. Kuhn and R. Z. Orlowski (2012). "Drug resistance to inhibitors of the human double minute-2 E3 ligase is mediated by point mutations of p53, but can be overcome with the p53 targeting agent RITA." Mol Cancer Ther 11(10): 2243-2253.
32. Kazemi, A., M. Safa and A. Shahbazi (2011). "RITA enhances chemosensitivity of pre-B ALL cells to doxorubicin by inducing p53-dependent apoptosis." Hematology 16(4): 225-231.
33. Kool, M., A. Korshunov, M. Remke, D. T. Jones, M. Schlanstein, P. A. Northcott, Y. J. Cho, J. Koster, A. Schouten-van Meeteren, D. van Vuurden, S. C. Clifford, T. Pietsch, A. O. von Bueren, S. Rutkowski, M. McCabe, V. P. Collins, M. L. Backlund, C. Haberler, F. Bourdeaut, O. Delattre, F. Doz, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. D. Taylor, P. Lichter and S. M. Pfister (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas." Acta Neuropathol 123(4): 473-484.
34. Kortmann, R. D., J. Kuhl, B. Timmermann, U. Mittler, C. Urban, V. Budach, E. Richter, N. Willich, M. Flentje, F. Berthold, I. Slavc, J. Wolff, C. Meisner, O. Wiestler, N. Sorensen, M. Warmuth-Metz and M. Bamberg (2000). "Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91." Int J Radiat Oncol Biol Phys 46(2): 269-279.
35. Krajewski, M., P. Ozdowy, L. D'Silva, U. Rothweiler and T. A. Holak (2005). "NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro." Nat Med 11(11): 1135-1136; author reply 1136-1137.
36. Kuhl, J. (1998). "Modern treatment strategies in medulloblastoma." Childs Nerv Syst 14(1-2): 2-5.
37. Kuhl, J. (2000). "HIT` 2000 Protokoll."
38. Kunkele, A., K. De Preter, L. Heukamp, T. Thor, K. W. Pajtler, W. Hartmann, M. Mittelbronn, M. A. Grotzer, H. E. Deubzer, F. Speleman, A. Schramm, A. Eggert

- and J. H. Schulte (2012). "Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas." Neuro Oncol 14(7): 859-869.
39. Lane, D. P., C. J. Brown, C. Verma and C. F. Cheok (2011). "New insights into p53 based therapy." Discov Med 12(63): 107-117.
40. Lee, M. H. and G. Lozano (2006). "Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins." Semin Cancer Biol 16(3): 225-234.
41. Ludwig, R. L., S. Bates and K. H. Vousden (1996). "Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function." Mol Cell Biol 16(9): 4952-4960.
42. Malek, R., J. Matta, N. Taylor, M. E. Perry and S. M. Mendrysa (2011). "The p53 inhibitor MDM2 facilitates Sonic Hedgehog-mediated tumorigenesis and influences cerebellar foliation." PLoS One 6(3): e17884.
43. Martins, C. P., L. Brown-Swigart and G. I. Evan (2006). "Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors." Cell 127(7): 1323-1334.
44. Massimino, M., G. Cefalo, D. Riva, V. Biassoni, F. Spreafico, E. Pecori, G. Poggi, P. Collini, B. Pollo, L. Valentini, P. Potepan, E. Seregni, M. Casanova, A. Ferrari, R. Luksch, D. Polastri, M. Terenziani, F. Pallotti, C. A. Clerici, E. Schiavello, F. Simonetti, C. Meazza, S. Catania, M. Podda and L. Gandola (2012). "Long-term results of combined preradiation chemotherapy and age-tailored radiotherapy doses for childhood medulloblastoma." J Neurooncol 108(1): 163-171.
45. McNeil, D. E., T. R. Cote, L. Clegg and L. B. Rorke (2002). "Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a SEER update. Surveillance Epidemiology and End Results." Med Pediatr Oncol 39(3): 190-194.
46. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.
47. Nagy, R., K. Sweet and C. Eng (2004). "Highly penetrant hereditary cancer syndromes." Oncogene 23(38): 6445-6470.

48. Papazoglu, C. and A. A. Mills (2007). "p53: at the crossroad between cancer and ageing." J Pathol 211(2): 124-133.
49. Picksley, S. M., B. Vojtesek, A. Sparks and D. P. Lane (1994). "Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides." Oncogene 9(9): 2523-2529.
50. Prados, M. D., M. S. Edwards, S. M. Chang, C. Russo, R. Davis, J. Rabbitt, M. Page, K. Lamborn and W. M. Wara (1999). "Hyperfractionated craniospinal radiation therapy for primitive neuroectodermal tumors: results of a Phase II study." Int J Radiat Oncol Biol Phys 43(2): 279-285.
51. Rodriguez, R. and M. Meuth (2006). "Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress." Mol Biol Cell 17(1): 402-412.
52. Rosenfeld, M. R., P. Meneses, J. Dalmau, M. Drobnjak, C. Cordon-Cardo and M. G. Kaplitt (1995). "Gene transfer of wild-type p53 results in restoration of tumor-suppressor function in a medulloblastoma cell line." Neurology 45(8): 1533-1539.
53. Rutkowski, S., U. Bode, F. Deinlein, H. Ottensmeier, M. Warmuth-Metz, N. Soerensen, N. Graf, A. Emser, T. Pietsch, J. E. Wolff, R. D. Kortmann and J. Kuehl (2005). "Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone." N Engl J Med 352(10): 978-986.
54. Ryan, K. M., A. C. Phillips and K. H. Vousden (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Curr Opin Cell Biol 13(3): 332-337.
55. Saha, M. N., H. Jiang, A. Mukai and H. Chang (2010). "RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses." Mol Cancer Ther 9(11): 3041-3051.
56. Saha, M. N., H. Jiang, Y. Yang, X. Zhu, X. Wang, A. D. Schimmer, L. Qiu and H. Chang (2012). "Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma." PLoS One 7(1): e30215.

57. Saha, M. N., L. Qiu and H. Chang (2013). "Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies." J Hematol Oncol 6: 23.
58. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-491.
59. Saylors, R. L., 3rd, D. Sidransky, H. S. Friedman, S. H. Bigner, D. D. Bigner, B. Vogelstein and G. M. Brodeur (1991). "Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas." Cancer Res 51(17): 4721-4723.
60. Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem 166(2): 368-379.
61. Selivanova, G. (2004). "p53: fighting cancer." Curr Cancer Drug Targets 4(5): 385-402.
62. Selivanova, G. (2010). "Therapeutic targeting of p53 by small molecules." Semin Cancer Biol 20(1): 46-56.
63. Shangary, S. and S. Wang (2008). "Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy." Clin Cancer Res 14(17): 5318-5324.
64. Shangary, S. and S. Wang (2009). "Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy." Annu Rev Pharmacol Toxicol 49: 223-241.
65. Smith, P. D., S. Crossland, G. Parker, P. Osin, L. Brooks, J. Waller, E. Philp, M. R. Crompton, B. A. Gusterson, M. J. Allday and T. Crook (1999). "Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions." Oncogene 18(15): 2451-2459.
66. Soussi, T. and G. Lozano (2005). "p53 mutation heterogeneity in cancer." Biochem Biophys Res Commun 331(3): 834-842.
67. Stegh, A. H. (2012). "Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils." Expert Opin Ther Targets 16(1): 67-83.

68. Suad, O., H. Rozenberg, R. Brosh, Y. Diskin-Posner, N. Kessler, L. J. Shimon, F. Frolow, A. Liran, V. Rotter and Z. Shakked (2009). "Structural basis of restoring sequence-specific DNA binding and transactivation to mutant p53 by suppressor mutations." J Mol Biol 385(1): 249-265.
69. Surget, S., G. Descamps, C. Brosseau, V. Normant, S. Maiga, P. Gomez-Bougie, N. Gouy-Colin, C. Godon, M. C. Bene, P. Moreau, S. Le Gouill, M. Amiot and C. Pellat-Deceunynck (2014). "RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway." BMC Cancer 14: 437.
70. Tarbell, N. J., J. S. Loeffler, B. Silver, E. Lynch, B. L. Lavally, W. J. Kupsky, R. M. Scott and S. E. Sallan (1991). "The change in patterns of relapse in medulloblastoma." Cancer 68(7): 1600-1604.
71. Taylor, M. D., P. A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y. J. Cho, S. C. Clifford, C. G. Eberhart, D. W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D. W. Ellison, P. Lichter, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. Kool and S. M. Pfister (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus." Acta Neuropathol 123(4): 465-472.
72. Toledo, F. and G. M. Wahl (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." Nat Rev Cancer 6(12): 909-923.
73. Ventura, A., D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder and T. Jacks (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo." Nature 445(7128): 661-665.
74. Wang, W. and W. S. El-Deiry (2008). "Restoration of p53 to limit tumor growth." Curr Opin Oncol 20(1): 90-96.
75. Weilbacher, A., M. Gutekunst, M. Oren, W. E. Aulitzky and H. van der Kuip (2014). "RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38." Cell Death Dis 5: e1318.
76. Wu, H., S. L. Pomeroy, M. Ferreira, N. Teider, J. Mariani, K. I. Nakayama, S. Hatakeyama, V. A. Tron, L. F. Saltibus, L. Spyropoulos and R. P. Leng (2011).

"UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53."

Nat Med 17(3): 347-355.

77. Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo and S. W. Lowe (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature 445(7128): 656-660.

78. Yang, J., A. Ahmed, E. Poon, N. Perusinghe, A. de Haven Brandon, G. Box, M. Valenti, S. Eccles, K. Rouschop, B. Wouters and M. Ashcroft (2009). "Small-molecule activation of p53 blocks hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in vivo and leads to tumor cell apoptosis in normoxia and hypoxia." Mol Cell Biol 29(8): 2243-2253.

79. Zhao, C. Y., V. V. Grinkevich, F. Nikulenkoy, W. Bao and G. Selivanova (2010). "Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA." Cell Cycle 9(9): 1847-1855.

9. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua deion.	Deionisiertes Wasser
aCGH	<i>Array-comparative genomic hybridization</i>
bp	Basenpaar
BrdU	5-bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Rinderserum – Albumin
ca.	circa
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre DNA)
CO ₂	Kohlendioxid
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Rinderserum)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
fwd	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
G1-Phase	Postmitose
G2/M-Phase	Prämitose und Mitose

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H&E	Hematoxylin & Eosin
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
i.p.	intraperitoneal
JNK pathway	c-Jun N- terminal -Kinase
kDa	Kilo- Dalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDM-2	<i>mouse double minutes-2</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid
MYCN	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogen ,neuroblastoma derived</i>
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentium hydrogenium</i>
PNET	Peripherer Neuroektodermaler Tumor
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT- PCR	Reverse Transkriptions- PCR

S-Phase	Synthese Phase des Zellzyklus
SAPK pathway	stress-activated protein kinase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>silencer</i> RNA
ssDNA	<i>single- stranded DNA</i>
ssRNA	<i>single- stranded RNA</i>
TAE	Tris- Acetat- EDTA- Puffer
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Wt	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zelluläre Mechanismen, die durch p53 gesteuert werden. Modifiziert nach Di Cintio (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010)	S.14
Abb. 2:	Chemische Struktur von RITA	S.19
Abb. 3:	Schaubild der Wirkung von RITA. Modifiziert nach Di Cintio (Di Cintio, Di Gennaro et al. 2010)	S.19
Abb. 4:	Reduzierte Konfluenz von Medulloblastomzellen nach RITA- Behandlung.	S.46
Abb. 5:	Zellviabilitätsassay der HD-MB3	S.48
Abb. 6:	Zellviabilitätsassay der ONS-76	S.48
Abb. 7:	Zellviabilitätsassay der D-341	S.49
Abb. 8:	Zellviabilitätsassay der DAOY	S.50
Abb. 9:	Zellviabilitätsassay der UW-228	S.50
Abb. 10:	Alle IC50s der fünf Medulloblastomzelllinien im Überblick nach 72 Std- RITA Behandlung.	S.51
Abb. 11:	Induktion von Apoptose nach RITA- Behandlung.	S.52
Abb. 12:	Reduktion von Proliferation nach RITA- Behandlung.	S.53
Abb. 13:	Untersuchung der sub G1-Zellzyklusanteile bei Medulloblastomzelllinien nach RITA Behandlung	S.54
Abb. 14:	Verschiebung des Zellzyklus bei Medulloblastomzelllinien nach RITA Behandlung	S.55
Abb. 15:	PCR zum Überprüfen des eingebrachten Vektors um p53 in den HD-MB3 auszuschalten.	S.56
Abb. 16:	Reduktion der Zellviabilität der HD-MB3-dnp53 nach RITA- Behandlung	S.57
Abb. 17:	IC 50- Daten der transfizierten HD-MB3-dnp53 im Vergleich zu den nicht transfizierten HD-MB3	S.58
Abb. 18:	Abnahme der Apoptoserate nach RITA- Behandlung bei dominant negativen p53 HD-MB3 und ONS-76 Zellen.	S.59

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 19:	Keine vermehrte Proliferation nach RITA- Behandlung bei dominant negativem p53 HD-MB3 und ONS-76 Zellen.	S.60
Abb. 20:	Modulation der Expression von p21, p53 und MDM-2 bei Medulloblastomzellen nach RITA- Behandlung.	S.61
Abb. 21:	mRNA- Expression von p21 nach RITA- Behandlung.	S.62
Abb. 22:	mRNA- Expression von MDM-2 nach RITA- Behandlung.	S.63
Abb. 23:	Wachstum von Tumoren im nu/nu Mausmodell	S.64
Abb. 24:	Kaplan-Meier Analyse des tumorfreien Überlebens	S.65
Abb. 25:	Molekulare Charakteristika der <i>in vivo</i> Tumorzellen nach RITA- Behandlung	S.66
Abb. 26:	Vergleiche der Expression von Apoptose- und Proliferationsmarker in Xenografts nach RITA- Behandlung	S.68
Abb. 27:	Vergleiche der Expression von p53- Zielgenen in Xenograft- Mäusen	S.68
Abb. 28:	Expression von MDM-2 nach RITA- Behandlung <i>in vivo</i> .	S.69
Abb. 29:	Expression von p21 nach RITA- Behandlung <i>in vivo</i> .	S.70
Abb. 30:	Expression von p53 nach RITA- Behandlung <i>in vivo</i> .	S.70

10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Stadieneinteilung für Medulloblastome nach Chang (Chang et al.1969)	S.10
Tab. 2:	Subgruppen des Medulloblastoms	S.11
Tab. 3:	Verwendete Zelllinien	S.22
Tab. 4:	Verwendete Plasmide	S.22
Tab. 5:	Verwendete Zellkulturlösungen und Antibiotika	S.23
Tab. 6:	Verwendete Chemikalien	S.23
Tab. 7:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	S.25
Tab. 8:	Verwendete Enzyme	S.27
Tab. 9:	Verwendete Antikörper und Detektionsenzyme für Western Blot	S.27
Tab. 10:	Verwendete Antikörper für immunohistochemischen Nachweis von Proteinen auf Gewebeabschnitten	S.28
Tab. 11:	Verwendete Kits	S.29
Tab. 12:	Verwendete Oligonukleotide (Primer) für qPCR	S.29
Tab. 13:	Verwendete Geräte	S.30
Tab. 14:	Pipettierschema für die Standardreihe mit BSA	S.36
Tab. 15:	Verwendete Oligonukleotidprimer, ihre Basenpaarlänge und ihre Annealing Temperatur für die PCR	S.41
Tab. 16:	Übersicht über die jeweils ausgesäten Zellzahlen für die 96-well Platte	S.47

11. Anhang

11.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annette Künkele und Herrn Prof. Dr. Johannes Schulte für die Überlassung des hochinteressanten Themas sowie die exzellente und engagierte wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion.

Bei Herrn PD Dr. Alexander Schramm möchte ich mich für die konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift bedanken.

Allen Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Labors der Kinderklinik III, besonders Dr. Kristina Althoff, Andrea Odersky, Dr. Sven Lindner, Sabine Dreesmann, Simon Schäfers, Natalie Sadowski, Dr. Annika Sprüssel, Anja Rieb, Dr. Harald Stephan und Dr. Theresa Thor, danke ich für die tatkräftige Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und das tolle Arbeitsklima.

Ebenfalls mein besonderer Dank für wichtige Beiträge zu dem Projekt gilt unseren Kooperationspartnern PD Dr. Lukas Heukamp und Alexandra Florin (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln).

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.

11.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online- Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11.3 Kongressbeiträge und Publikationen

11.3.1 Kongressbeiträge

XXV. Jahrestagung der Kind – Philipp – Stiftung für Leukämieforschung
06.06.-09.06.2012

11.3.2 Posterpräsentation

10. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-
Essen, 25. November 2011

11.3.3 Publikation

eingereicht, siehe Seite 3